

Interdisciplinarno istraživanje mutanata E480Q i T481M ljudske dipeptidil-peptidaze III

Martinčić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:875563>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Monika Martinčić

**Interdisciplinarno istraživanje mutanata
E480Q i T481M ljudske dipeptidil-peptidaze III**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Monika Martinčić

**Interdisciplinarno istraživanje mutanata
E480Q i T481M ljudske dipeptidil-peptidaze III**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
Komentor: doc. dr. sc. Mihaela Matovina
Neposredni voditelj: Sara Matić, mag. mol. biol.

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

INTERDISCIPLINARNO ISTRAŽIVANJE MUTANATA E480Q I T481M LJUDSKE DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III

Monika Martinčić

Rad je izrađen na: Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: doc. dr. sc. Mihaela Matovina

Neposredni voditelj: Sara Matić, mag. mol. biol.

Sažetak

Ljudska dipeptidil-peptidaza III (hDPP III) je metalopeptidaza koja cijepa dipeptide sa N-kraja oligopeptida, te posjeduje ETGE vezni motiv kao i transkripcijski faktor Nrf2. Nrf2 je odgovoran za aktivaciju ekspresije gena vezanih za antioksidativnu obranu stanice. Kada nema oksidativnog stresa, Nrf2 je vezan na protein Keap1 čime se omogućuje njegova ubikvitinacija. Pojavom oksidativnog stresa, Nrf2 se oslobađa iz kompleksa i translocira u jezgru gdje aktivira ekspresiju gena. Kompetativnim vezanjem proteina hDPP III na Keap1 onemogućava se ubikvitinacija Nrf2 čime se povećava njegova akumulacija u stanici.

U ovom radu, u bakterijama su proizvedeni i pročišćeni mutanti proteina hDPPP III s mutacijama dviju aminokiselina (T481M i E480Q) čije su genomske sekvence pronađene na cBio portalu za genomiku raka. Biokemijskom karakterizacijom i usporedbom afiniteta vezanja divljeg tipa i mutiranih proteina ispitana je interakcija hDPP III s domenom Kelch proteina Keap1. Na temelju rezultata ovog ispitivanja mogu se donijeti pretpostavke o doprinosu mutacija na otpornost stanica raka na oksidativni stres.

Diplomski rad obuhvaća: 53 stranica, 30 slika, 12 tablica, 69 literaturna navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: dipeptidil-peptidaza III / dinamičko raspršenje svjetlosti / enzimska kinetika / Keap1 / Kelch / mutageneza / specifična aktivnost

Rad prihvaćen: 19. srpnja 2021.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Olivera Galović

2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

3. doc. dr. sc. Mihaela Matovina

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; research study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

INTERDISCIPLINARY INVESTIGATION OF THE HUMAN DIPEPTIDYL PEPTIDASE III MUTANTS E480Q AND T481M

Monika Martinčić

Thesis completed at: Ruđer Bošković Institute, Laboratory for Protein Biochemistry and Molecular Modelling, Bijenička cesta, 10000 Zagreb

Supervisor: Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., Assistant Professor

Mentor: Mihaela Matovina, Ph.D., Research Associate

Assistant mentor: Sara Matić, mag. mol.biol.

Abstract

Human dipeptidyl-peptidase III (hDPP III) is a metallopeptidase that cleaves dipeptides from the N-terminus of the oligopeptide and has an ETGE binding motif as well as the transcription factor Nrf2. Nrf2 is responsible for activating the expression of genes associated with antioxidant cell defense. When there is no oxidative stress, Nrf2 is bound to Keap1 protein and thus allowing the ubiquitination of Nrf2. With the appearance of oxidative stress, Nrf2 is released from the complex and translocated into the nucleus where it triggers gene expression. Competitive binding of the hDPP III protein to Keap1 prevents the ubiquitination of Nrf2, which in turn increases the accumulation of Nrf2 in the cell.

In this thesis, mutants of the hDPPP III protein with mutations of two amino acids (T481M and E480Q), whose genomic sequences were found on the cBio portal for cancer genomics, were produced in bacteria and purified. The interaction of hDPP III with the Keap1 protein was examined by biochemical characterization and by comparison of the binding affinity of wild-type and mutated proteins. Based on the results of this study, assumptions can be made about the contribution of the mutations to cancer cell resistance to oxidative stress.

Thesis includes: 53 pages, 30 figures, 12 tables, 69 references

Original in: Croatian

Keywords: dipeptidyl peptidase III / dynamic light scattering / enzymatic kinetics / Keap1 / Kelch / mutagenesis / specific activity

Thesis accepted: 19 July 2021

Reviewers:

1. Olivera Galović, Ph.D., Ph.D., Assistant Professor
2. Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., Assistant Professor
3. Mihaela Matovina, Ph.D., Research Associate

Substitute: Martina Medvidović-Kosanović, Ph.D., Associate Professor

Thesis deposited in: Library Department of Chemistry, 8/A cara Hadrijana, Osijek

SADRŽAJ

SADRŽAJ	VIII
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Peptidaze-proteolitički enzimi	3
2.1.1. Metalopeptidaze	4
2.2. Dipeptidil-peptidaza III.....	5
2.2.1. Struktura i katalitički mehanizam.....	6
2.2.2. Signalni put Nrf2-Keap1	9
2.3. Enzimska kinetika.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Marker veličine i boje.....	14
3.1.3. Enzimi	14
3.1.4. Sintetski supstrati	14
3.1.5. Plazmidi i bakterijski sojevi	14
3.1.6. Komercijalni kompleti.....	14
3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	15
3.2.1. In vitro mutageneza	15
3.3. Metode rada s bakterijama	20
3.3.1. Kemijska transformacija bakterija XL-10 Gold	20
3.3.2. Postavljanje prekonočne bakterijske kulture	21
3.3.3. Izolacija i pročišćavanje plazmida.....	21
3.3.4. Fizikalna transformacija bakterija BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	23
3.3.5. Uzgoj prekonočne bakterijske kulture i kulture za ekspresiju proteina.....	23
3.3.6. Liza i sonikacija bakterijskih stanica.....	25
3.4. Metode rada s proteinima	26
3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom.....	26
3.4.2. Analiza proteina SDS-poliakrilamid gel elektroforezom	28

3.4.3.	Odsoljavanje proteina na PD-10 koloni	30
3.5.	Biokemijska karakterizacija proteina.....	31
3.5.1.	Nativna gel elektroforeza	31
3.5.2.	Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	32
3.5.3.	Test specifične aktivnosti enzima.....	32
3.5.4.	Mjerenje enzimske kinetike.....	34
4.	REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1.	Analiza pročišćavanja proteina	35
4.2.	Analiza vezanja hDPP III sa Keap1	38
4.2.1.	Nativna elektroforeza	38
4.2.2.	Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	39
4.3.	Analiza aktivnosti enzima	43
4.3.1.	Test specifične aktivnosti	43
4.3.2.	Kinetika enzimske reakcije.....	45
5.	ZAKLJUČAK	48
6.	LITERATURNI IZVORI.....	50
7.	ŽIVOTOPIS	LIV

1. UVOD

Peptidaze ili proteolitički enzimi su enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu. Prema mjestu cijepanja peptidne veze razlikujemo endopeptidaze koje cijepaju unutar polipeptidnog lanca i egzopeptidaze koje cijepaju na N- ili C- kraju polipeptidnog lanca [1]. Ukoliko se u aktivnom mjestu peptidaze nalazi metalni ion onda govorimo o metalopeptidazama. Peptidaze i metalopeptidaze esencijalne su za normalno funkcioniranje organizma. Njihovom deregulacijom javljaju se razni neurološki i kardiovaskularni poremećaji, te dolazi do pojave raka [2].

Ljudska dipeptidil peptidaza III (hDPP III) je o cinku ovisna metalopeptidaza koja djeluje kao egzopeptidaza odcijepljujući dipeptide sa N- kraja supstrata koji se sastoje od 3 - 10 aminokiselina [3]. Patofiziološka uloga ovog enzima nije još dovoljno istražena međutim kod tumora jajnika primijećena je povećana specifična aktivnost što se povezuje s povećanom ekspresijom enzima. Smatra se da bi povećana specifična aktivnost mogla biti indikator malignosti jajnika i endometrija [4].

Dipeptidil peptidaza III sudjeluje u signalnom putu transkripcijskog faktora Nrf2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) i proteina Keap1 (engl. *Kelch Like ECH Associated Protein 1*). U uvjetima oksidativnog stresa, Nrf2 se translocira u jezgru i aktivira gene bitne za antioksidativnu obranu stanice. Kada nema oksidativnog stresa, Nrf2 je preko ETGE motiva vezan na Kelch domenu proteina Keap1 čime se omogućuje ubikvitinacija faktora Nrf2. [5]. Mogući mehanizam za onemogućavanje ubikvitinacije Nrf2 je kompetitivno vezanje proteina koji sadrže isti ili sličan motiv kao i Nrf2. Jedan od takvih proteina je hDPP III koji sadrži ETGE motiv u svojoj fleksibilnoj petlji i kompetitivno veže protein Keap1 [6].

U cBio portalu za genomiku raka nađene su genomske sekvence mutanata DPP III koje bi mogle biti uključene u sam razvoj raka [7]. Za potrebe ovog diplomskog rada istražena su dva mutanta hDPP III kojima je uvedena mutacija aminokiselina na 480. i 481. mjestu odnosno E480Q i T481M. Obje mutacije nalaze se blizu aktivnog mjesta enzima koji se nalazi u obliku karakterističnog strukturnog motiva (HEXXGH i EECRAE) na poziciji 450-455 [8].

Za ciljanu *in vitro* mutagenezu korišten je vektor pLATE31 koji u sebi ima ugrađen gen za hDPP III s histidinskim privjeskom i unaprijed dizajnirane početnice za mutagenezu koje imaju supstituiranu jednu bazu. Kemijskom transformacijom vektor je unesen u

ultrakompetentne bakterijske stanice *Escherichia coli* (*E. coli*). Nakon uzgoja bakterijskih kultura izolirani su rekombinantni plazmidi. Uspješnost mutacije plazmida utvrđena je sekvenciranjem. Nakon toga su rekombinantni plazmidi metodom elektroporacije transformirani u elektrokompetentne stanice bakterije *E. coli*. Dobivene bakterijske kulture s proteinom od interesa podvrgnute su lizi i sonikaciji. Ekspimirani proteini sadrže šest uzastopnih histidina na C-kraju lanca zbog čega je omogućeno njegovo pročišćavanje afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionom nikla. Nakon pročišćavanja na Ni-NTA kolonama određena je analiza čistoće uzoraka SDS-poliakrilamid gel elektroforezom poslije čega su proteini odsoljeni na PD-10 koloni metodom gel-filtracije. Odsoljeni proteini podvrgnuti su nativnoj elektroforezi sa i bez Kelch domene kako bi se utvrdila učinkovitost vezanja. Biokemijska karakterizacija enzima provedena je mjerenjem specifične aktivnosti prema sintetskom supstratu diarginil-2-naftilamid. Kinetički parametri određeni su mjerenjem fluorescencije 2-naftilamida koji nastaje djelovanjem enzima s diarginil-2-naftilamidom. Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti dodatno je određeno vezanje dobivenih mutanata hDPP III s Kelch domenom proteina Keap1. Kako bismo mogli usporediti rezultate mjerenja, sva mjerenja napravljena su paralelno i za „divlji“ tip hDPP III kao i za mutante E480Q i T481M.

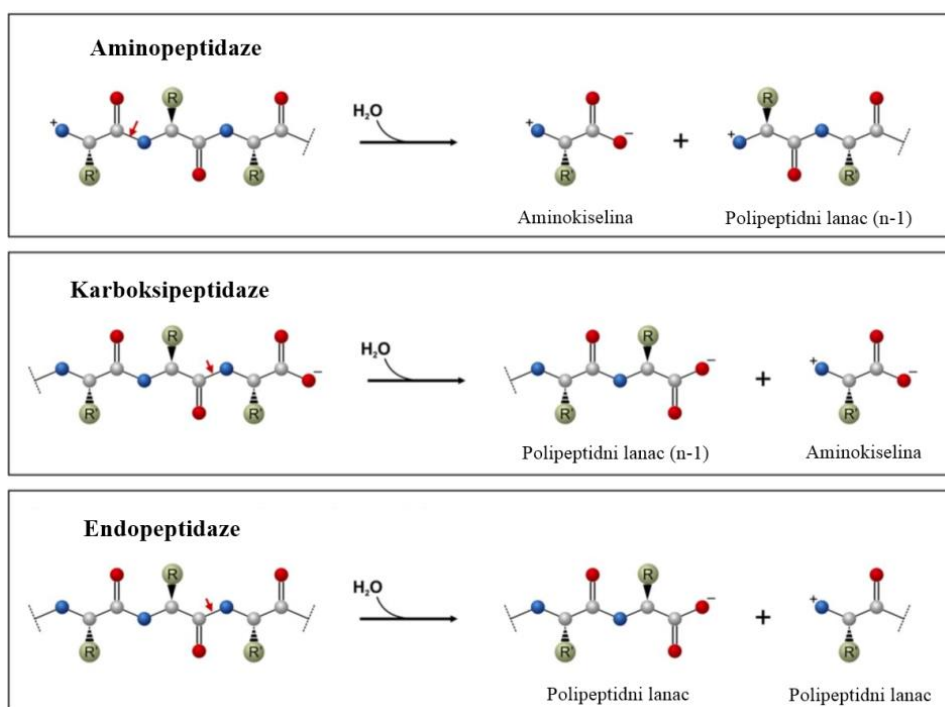
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Peptidaze - proteolitički enzimi

Prema vrsti reakcije koju kataliziraju, enzimi se dijele na 6 skupina, a to su hidrolaze, izomeraze, ligaze, liaze, oksidoreduktaze i transferaze. Enzimske skupine dalje se dijele na podskupine ovisno o vrsti veze na kojoj se odvija enzimska reakcija. Pomoću EC oznake (engl. *Enzyme Commission*) koja se sastoji od četiri jedinstvena broja razlikuju se pojedini enzimi. Prvi broj predstavlja glavnu skupinu enzima, drugi broj podskupinu, treći podskupinu, a četvrti serijski broj [9].

U hidrolaznu skupinu enzima pripadaju peptidaze (EC 3) koje hidroliziraju peptidnu vezu zbog čega se svrstavaju u podskupinu EC 3.4. Budući da postoji više vrsta proteolitičkih enzima, oni se dalje mogu podijeliti prema mjestu djelovanja [10]. Ukoliko peptidaza cijepa peptidnu vezu u unutrašnjosti peptidnog lanca onda se naziva endopeptidaza, a ukoliko cijepa pri kraju peptidnog lanca onda je to egzopeptidaza. Egzopeptidaze se dalje dijele prema specifičnosti za N- ili C-kraj polipeptidnog lanca odnosno na aminopeptidaze i karboksipeptidaze (Slika 1). Dodatno se dijele i prema broju aminokiselina koje odcijepuju s N-kraja peptidnog lanca pri čemu razlikujemo aminopeptidaze koje odcijepuju jednu aminokiselinu, dipeptidil peptidaze dvije aminokiseline i tripeptidil-peptidaze tri aminokiseline [1].

Rawlings i Barrett [11] su predložili hijerarhijski sustav podjele peptidaza koji se koristi u bazi podataka MEROPS [12]. Peptidaze koje imaju statistički značajne sličnosti u primarnoj strukturi katalitičke domene svrstavaju se u iste obitelji, a homologne porodice svrstavaju se u klan. Ako nisu poznati homolozi, obitelj može sadržavati samo jedan enzim koji se označava slovom koje predstavlja katalitički tip peptidaze, uz jedinstveni broj tog enzima. Klan sadrži peptidaze koje su se razvile iz jednog evolucijskog izvora peptidaza i predstavlja jednu ili više obitelji koje su evolucijski povezane prema sličnostima tercijarnih struktura. Ukoliko tercijarna struktura nije poznata, evolucijska povezanost se dokazuje prema aminokiselinskim sljedovima u katalitičkim mjestima. Svaki se klan označava s dva slova od kojih prvi označava katalitički tip obitelji [13]. Proteinski inhibitori peptidaza također se svrstavaju u obitelji, odnosno klanove [14].



Slika 1. Podjela peptidaza prema mjestu cijepanja peptidne veze. Preuzeto i prilagođeno iz [1].

2.1.1. Metalopeptidaze

Metalopeptidaze (kratica MP) su enzimi koji su esencijalni za život jer cijepanjem peptidnih veza sudjeluju u svim glavnim fiziološkim procesima. Deregulacijom enzima može doći do razvoja mnogih bolesti poput raka, kardiovaskularnih i neuroloških poremećaja [2].

U aktivnom mjestu enzima je pomoću bočnih lanaca aminokiselina smješten katalitički metalni ion, najčešće je to ion cinka (Zn^{2+}), a može biti i kobalt (Co^{2+}), mangan (Mn^{2+}) ili nikal (Ni^{2+}) [15]. Neke metalopeptidaze sadrže dva metalna iona koji djeluju „ko-katalitički“, te one imaju egzopeptidnu aktivnost dok one koje sadrže jedan metalni ion mogu imati egzo- ili endopeptidnu aktivnost [16].

Zbog velike fleksibilnosti koordinacijske geometrije kao i njegove sposobnosti koordinacije s više liganada, metal cinka je najčešći kofaktor metalopeptidaza [17]. Takve MP posjeduju karakteristični strukturni motiv HEXXH odnosno His-Glu-Xaa-Xaa-His koji je dio veznog mjesta Zn^{2+} pri čemu je on vezan na histidinske ostatke [11].

2.2. Dipeptidil-peptidaza III

U tkivu sisavaca pronađena su četiri tipa dipeptidil-peptidaze (DPP I-IV) dok je DPP III otkrivena treća po redu zbog čega i nosi broj III. [18]. Dipeptidil-peptidaza III (EC 3.4.14.4) je o cinku ovisna metalopeptidaza koja djeluje kao egzopeptidaza. U bazi podataka MEROPS svrstana je u obitelj M49, te je ujedno i njezin jedini član [12]. Katalizira reakciju hidrolize peptidne veze odcjepljivanjem dipeptida s N-kraja supstrata koji se sastoji od 3 ili više aminokiselina [3].

Prvi puta je izolirana iz goveđe hipofize 1967. godine hidrolizom sintetskog supstrata Arg-Arg-2-naftilamid (Arg₂-2NA) i nazvana dipeptidil-arilamidaza III [19]. Naknadno je DPP III izolirana i iz drugih tkiva poput ljudske posteljice [20], mišića svinje [21], eritrocita [22], jetre štakora [23], kvasca (lat. *Saccharomyces cerevisiae*) [24], sluzave plijesni (lat. *Dictyostelium discoideum*) [25] i mnogih drugih. Pretežno se nalazi u citoplazmi kao monomerni protein molekulske mase 80-85 kDa i izoelektrične točke pI ~ 4,5 [20].

DPP III sudjeluje u završnoj fazi razgradnje proteina u stanici, ima regulatornu ulogu u endogenom sustavu regulacije boli i regulaciji krvnog tlaka. Patofiziološka uloga ljudske DPP III (hDPP III) je i dalje nedovoljno istražena, ali pretpostavlja se da sudjeluje u malignom rastu i zarazi virusom gripe [26]. U malignim tkivima jajnika izmjerena je povećana specifična aktivnost DPP III što se povezuje sa povećanom ekspresijom enzima. Povećana ekspresija DPP III primjećena je u raku pluća i raku dojke, te se povezuje s Nrf2-Keap1 signalnim putem [27, 28]. Nedavna istraživanja otkrila su da je DPP III jedan od aktivatora antioksidacijskog elementa (eng. *antioxidant response element*; ARE) zbog čega bi mogao doprinositi staničnoj obrani od oksidativnog stresa [29]. Utvrđeno je da je mehanizam putem kojeg dolazi do aktivacije ARE posredovan vezanjem DPP III na protein Keap1, uslijed čega dolazi do otpuštanja transkripcijskog faktora Nrf2 iz kompleksa s Keap1, njegove translokacije u jezgru i aktivacije promotora koji sadrže ARE [28].

Optimalna temperatura za aktivnost enzima je 37 °C dok pri temperaturi od 55 °C dolazi do potpunog gubitka aktivnosti. Većina pročišćenih enzima je osjetljiva na smrzavanje pri čemu dolazi do gubitka aktivnosti i do 60% dok čuvanjem enzima u glicerolu ($\phi = 0,40 - 0,50$) na temperaturi do -20 °C ne dolazi do značajnijeg gubitka aktivnosti [19, 22].

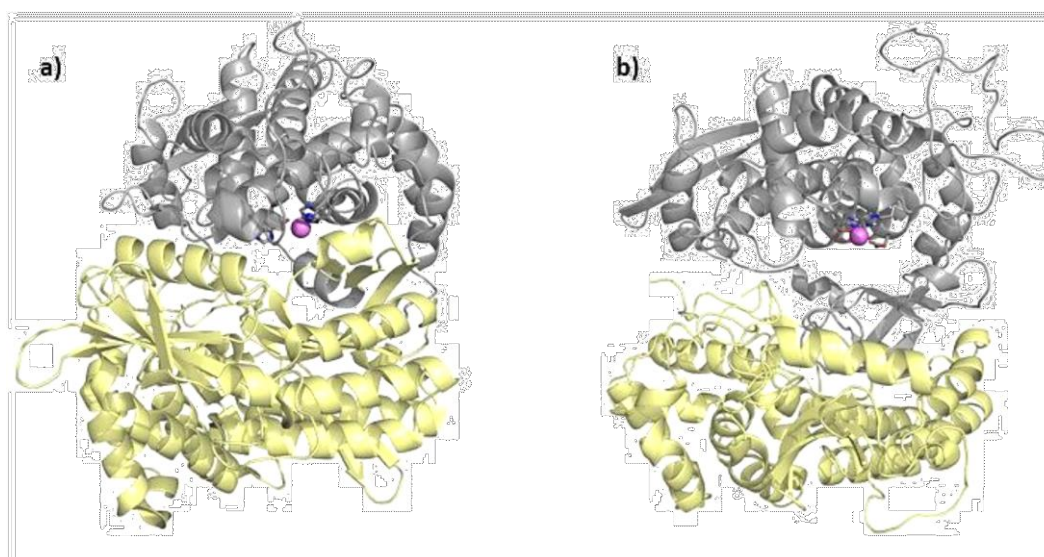
Pri blago lužnatim uvjetima (pH 8,0 – 9,0) DPP III pokazuje maksimalnu hidrolitičku aktivnost prema supstratu Arg-Arg-2NA. Enzim pokazuje široku specifičnost prema oligopeptidima dužine 3-10 aminokiselina kojima pripadaju i razni neuropeptidi [30].

Od prije je poznato da kelirajući, tiolni i reducirajući reagensi utječu inhibitory na aktivnost DPP III dok su novija istraživanja pokazala da dipeptidni derivati hidroksamske kiseline imaju kompetitivno inhibitory učinak na enzim [31].

2.2.1. Struktura i katalitički mehanizam

Kristalna struktura DPP III je prvi put određena iz kvasca (PDB kod: 3CSK) [32], a s ljudskom DPP III (PDB kod: 3FVY) dijeli oko 36% sličnosti po redoslijedu aminokiselinskih ostataka dok su im tercijarne strukture gotovo identične.

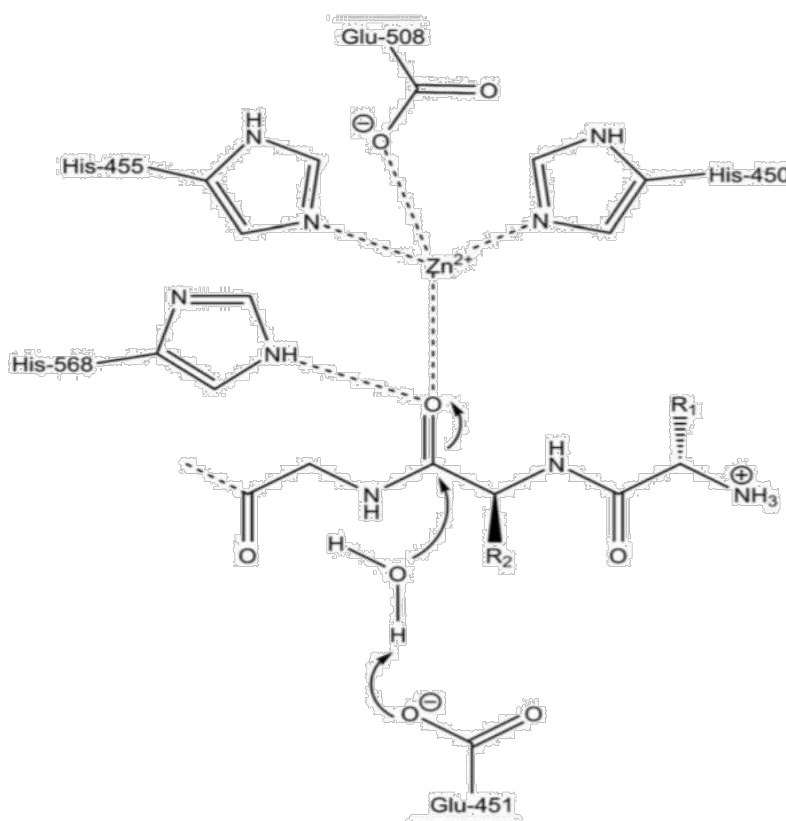
DPP III je monomerni protein koji se sastoji od dvije domene između kojih se nalazi velika pukotina. Na dnu tzv „gornje“ katalitičke domene nalazi se ion cinka kojeg koordiniraju dva histidinska ogranka (His450 i His455), glutamat (Glu508) i molekula vode. Karakteristični strukturni motiv za vezanje metalnog iona i hidrolizu peptidne veze je 450-HELLGH-455 odnosno His-Glu-Leu-Leu-Gly-His [23]. Drugi strukturni motiv koji pridonosi vezanju iona cinka je 507-EECRAE-512 odnosno Glu-Glu-Cys-Arg-Ala-Glu. Poznate su dvije strukture enzima, otvorena i zatvorena koje su prikazane na slici 2.



Slika 2. Struktura hDPP III: a) zatvorena (PDB kod: 5EGY) [33] b) otvorena (PDB kod: 3FVY) [34]. Gornja domena prikazana je sivom bojom, donja domena žutom bojom, a ion cinka kao ružičasta kuglica.

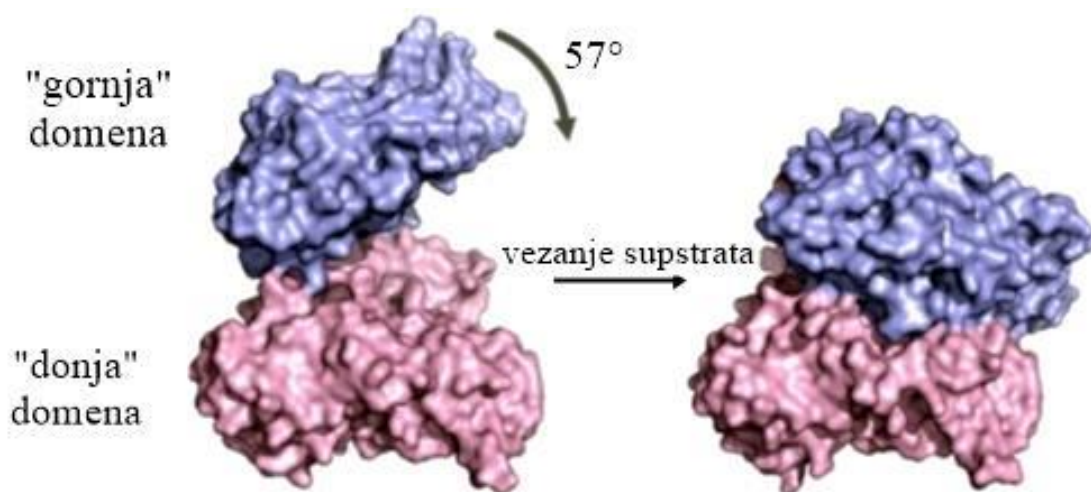
Aktivno mjesto enzima nalazi se u gornjoj domeni koja je pretežno građena od α -uzvojnica. Ion cinka je tetraedarski koordiniran s dva histidinska ogranka (His450 i His455), glutamatom (Glu508) i molekulom vode koji su dio karakterističnih strukturnih motiva. Donja domena građena je od kombinacije α -uzvojnica i β -ploča koje formiraju β -bačve. Domene su međusobno povezane brojnim fleksibilnim petljama [8].

Glu451 iz motiva HELLGH bitan je za katalitičku aktivnost enzima jer aktivira molekulu vode odgovornu za hidrolizu peptidne veze tako da se ponaša kao opća baza [35]. Na početku reakcijskog mehanizma Zn^{2+} započinje stvaranje interakcija s karbonilnim ugljikom supstrata, a Glu451 stvara vodikove veze sa vodom koja se nalazi u blizini karbonilnog ugljika povećavajući nukleofilnost vode. Zbog povećanja nukleofilnosti, voda napada karbonilni ugljik te dolazi do pucanja peptidne veze i odcjepljivanja dipeptida (Slika 4). Za vrijeme nukleofilnog napada, karbonilni kisik je stabiliziran ionom cinka i His568 dok je dušik peptidne veze supstrata stabiliziran s Glu451 i Tyr318 [32].



Slika 3. Mehanizam katalitičkog djelovanja hDPP III pri hidrolizi peptidne veze [32].

Istraživanja pokazuju da vezanjem supstrata Arg-Arg-2NA dolazi do reorganizacije veznog mjesta i njegovog djelomičnog zatvaranja (Slika 4). Naime, vezanjem supstrata dolazi do istiskivanja nekoliko desetaka molekula vode iz šupljine između domena. Do konformacijske promjene dolazi zbog povećanja entropije što objašnjava široku supstratnu specifičnost DPP III [36]. Izračunom slobodne energije vezanja pokazano je da se supstrat čvršće veže u zatvoreni nego otvoreni oblik enzima dok su rezultati simulacija prikazali da su aminokiseline Trp300, Tyr318, Asp372, Asn391, Arg399, Phe404, Lys405 i Asn406 važne za zatvaranje proteina kao i za stabilizaciju supstrata [37].



Slika 4. Prikaz vezanja supstrata i zatvaranja dviju domena kod enzima hDPP III. Preuzeto i prilagođeno iz [36].

Pojedini ioni metala mogu utjecati na konformaciju aminokiselinskih lanaca unutar enzima čime DPP III dovode u povoljan položaj za katalizu. Smatra se da ioni poput Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} i Sr^{2+} reaktivacijom enzima utječu na njegovu aktivnost. Metalni divalentni ioni bi također mogli zamijeniti ion cinka u aktivnom mjestu. Fukasawa i suradnici su proveli istraživanje u kojem su zamijenili ion cinka sa Co^{2+} , Ni^{2+} i Cu^{2+} kod DPP III štakora. Sva tri enzima pokazala su jednaku katalitičku aktivnost kao i Zn^{2+} -DPP III. Pretpostavlja se da zamjenom metalnog iona oni zadržavaju tetraedarsku koordinaciju što bi moglo biti povezano s fleksibilnošću motiva za vezanje metala [17].

2.2.2. Signalni put Nrf2-Keap1

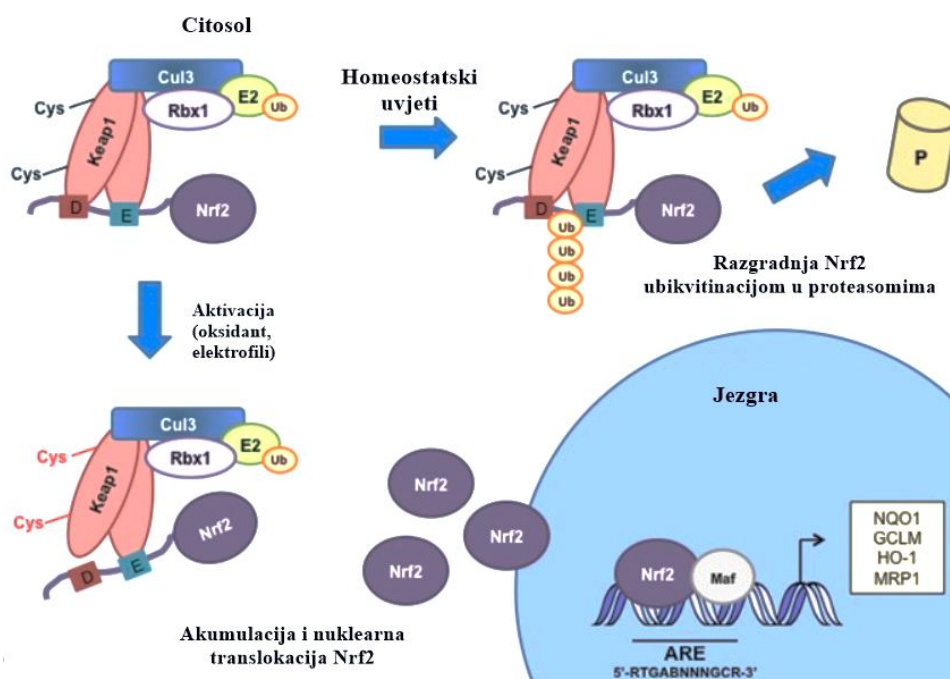
Eukariotske stanice posjeduju obrambeni mehanizam za suočavanje s oksidativnim stresom koji je nastao djelovanjem toksina ili kancerogenima. Jedan od najvažnijih staničnih obrambenih mehanizama uključuje djelovanje transkripcijskog faktora Nrf2 [38]. Signalni put Nrf2 - Keap1 jedan je od najvažnijih puteva obrane i preživljavanja stanica.

Transkripcijski nuklearni faktor Nrf2 pripada CNC obitelji (engl. *Cap 'N' Collar*) koja sadrži očuvanu strukturu osnovnog leucin zatvarača (bZIP). Sastoji se od 7 domena Neh1-7 (engl. *Nrf2-ECH homology domains*) od kojih se Neh2 sastoji od dva degrona ETGE i DLG. Degroni predstavljaju dio proteina koji je važan za regulaciju brzine razgradnje proteina [39]. Glavna funkcija Nrf2 je aktivacija transkripcije gena koji su odgovorni za obranu stanice od oksidativnog stresa. Istraživanja pokazuju da se aktivacijom obrambenog odgovora Nrf2 organizam štiti od različitih bolesti poput neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, raka, kardiovaskularnih bolesti i mnogih drugih [5, 40].

Keap1 veže E3 ubikvitin ligazu koja sadrži Cul3 (Cullin 3) i glavni je regulator transkripcijskog faktora Nrf2. Sastoji se od tri domene, BTB domene (engl. *broad complex/tramtrack/bric-a-brac*), IVR domene (intervenirajuća domena) i Kelch domene koja se još naziva i DGR domena (engl. *double glycine repeat*). Kelch domena je bitna za interakciju sa Nrf2 [41].

Kada nema oksidativnog stresa, Nrf2 je vezan u kompleksu s Keap1 preko protein-protein interakcija između Kelch domene (Keap1) i ETGE i DLG motiva (Neh2 domene faktora Nrf2). Protein Keap1 funkcionira kao dimer tako da jedan monomer veže motiv ETGE, a drugi monomer veže motiv DLG na istom monomeru Nrf2. Motiv ETGE se veže jače od motiva DLG. Na temelju tih opažanja, Tong i sur. su 2007. godine razvili model „šarka i zasuna“ (engl. *hinge and latch*) za prepoznavanje supstrata na dva mjesta koji opisuje interakciju između Nrf2 i Keap1 [42].

Model pretpostavlja da Keap1 veže Nrf2 preko motiva ETGE (šarka), a nakon toga motiv DLG (zasun) sjeda na susjednu domenu Kelch. Dvije molekule proteina Keap1 smještaju sedam aminokiselinskih ostataka lizina, koji se nalaze između motiva ETGE i DLG, u povoljan položaj za ubikvitinaciju i proteasomsku razgradnju Nrf2. Prema tome, kompleks Keap1-Cul3-E3 ubikvitin ligaze čvrsto regulira protein Nrf2 i održava ga na niskoj razini [42].



Slika 5. Model „šarka i zasuna“: interakcija Nrf2 – Keap1. U homeostatskim uvjetima, vezni motiv ETGE transkripcijskog faktora Nrf2 (šarka, označen plavom bojom i slovom E) veže se za protein Keap1. Nakon toga vezni motiv DLG transkripcijskog faktora Nrf2 (zasun, označen smeđom bojom i slovom D) sjeda na susjednu domenu Kelch proteina Keap1. Takvo vezanje omogućuje smještanje ostataka lizina na Nrf2 između motiva ETGE i DLG u povoljan položaj za ubikvitinaciju (označeno sa Ub). Preuzeto i prilagođeno iz [43].

Sve veći broj istraživanja pokazuje povećanu razinu Nrf2 kod tumora kao rezultat vezanja Keap1 na proteine koji sadrže isti ili sličan motiv. Do sada je pronađen široki spektar proteina koji mogu deregulirati put Nrf2-Keap1 vezanjem na Keap1 i oslobađanjem Nrf2 iz kompleksa s proteinom Keap1 [43].

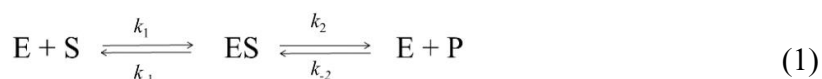
Jedan od proteina koji dovodi do deregulacije signalnog puta Nrf2-Keap1 je DPP III. Motiv ETGE proteina DPP III smješten je na fleksibilnoj petlji i kompetitivno veže protein Keap1. U nedavnom istraživanju prilikom izvođenja MD simulacija, ETGE motiv bio je povezan s DPP III uz formiranje jakih vodikovih veza sa Arg623 i Arg624 zbog čega se pretpostavlja da je vezanje DPP III-Kelch mehanizam u dva koraka. U prvom koraku dolazi do endergonične translokacije petlje nakon čega slijedi egzergonična interakcija DPP III i Kelch domene [44].

Genomske sekvence mutanata DPP III nađene su u stanicama raka, te bi one mogle biti uključene u sam razvoj raka zbog sudjelovanja u signalnom putu Nrf2-Keap1. Kod raka dojke primijećena je prekomjerna ekspresija DPP III povezana s aktivacijom gena koji su kontrolirani proteinom Nrf2. Prema tome, identifikacija prekomjerne ekspresije DPP III i transkripcijskog faktora Nrf2 mogla bi predstavljati potencijalne biomarkere za prognozu raka dojke [27].

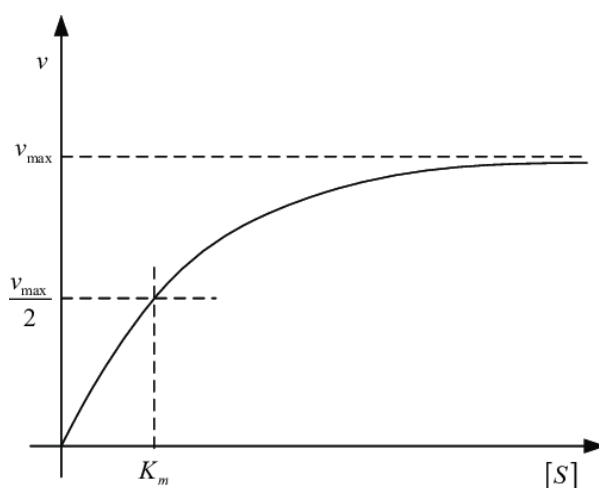
2.3. Enzimska kinetika

Enzimska kinetika se bavi proučavanjem brzine enzimske reakcije i pomaže nam shvatiti kako enzimi djeluju. Biokemičar L. Michaelis i biokemičarka M. Menten (1913. godine) predložili su jednostavni model koji objašnjava kinetička svojstva, te je prema njima nazvan Michaelis-Menten model koji se koristi i danas [45].

Model se temelji na nastanku kompleksa enzim-supstrat (jednadžba 1):



Kao rezultat mjerenja brzine reakcije za svaku koncentraciju supstrata konstruira se graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata u kojem se vidi da se brzina povećava s povećanjem koncentracije supstrata (Slika 6).



Slika 6. Michaelis-Menten dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije (v) o koncentraciji supstrata ($[S]$) [46].

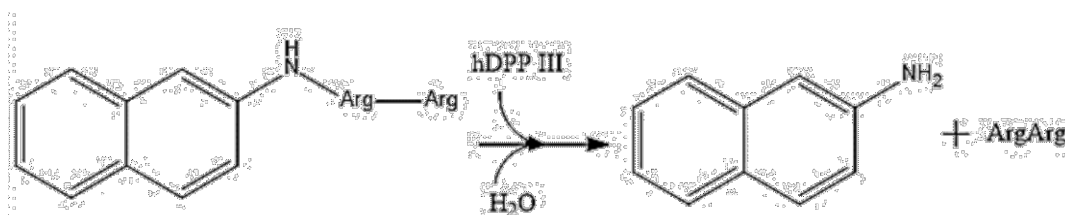
Bitni parametri za određivanje karakteristika enzima i supstrata su Michaelisova konstanta (K_M), maksimalna brzina (V_{max}) i obrtni broj enzima (k_{cat}). Michaelisova konstanta jednaka je koncentraciji supstrata kod koje se postiže brzina $V_{max}/2$, te ona ima dva značenja. Prvo, K_M predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je popunjena polovica aktivnih mjesta odnosno govori o koncentraciji supstrata koja je potrebna da se postigne značajna kataliza. Drugo, mjera je čvrstoće kompleksa ES, visoki K_M označava slabo vezanje dok niski K_M čvrsto vezanje. Maksimalna brzina (V_{max}) postiže se kada su sva katalitička mjesta na enzimu zasićena supstratom, te ukoliko je poznata koncentracija aktivnih mjesta $[E]_T$ može se odrediti k_{cat} dijeljenjem brzine s koncentracijom. Obrtni broj enzima (k_{cat}) predstavlja broj molekula supstrata koji molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena. Parametar koji predodžuje mjeru katalitičke efikasnosti je omjer k_{cat}/K_M (konstanta specifičnosti) jer uključuje brzinu katalize s određenim supstratom (k_{cat}) i jačinu interakcije enzim-supstrat (K_M). Usporedba konstanti specifičnosti k_{cat}/K_M također se može koristiti kao mjera sklonosti enzima prema različitim supstratima[45].

Nedavna istraživanja pokazala su da je korištenje omjera k_{cat}/K_M neodgovarajuće za opis učinkovitosti biokatalizatora osobito kada se koristi kao kriterij za izbor između varijanti enzima u industrijske svrhe. Glavni problem je što ovaj parametar zanemaruje doprinos važnih čimbenika koji djeluju u stvarnim uvjetima katalize poput koncentracije supstrata i inhibicije enzima što dovodi do nestvarnih očekivanja o učinku enzima i pogrešnog odabira odgovarajućeg biokatalizatora [47].

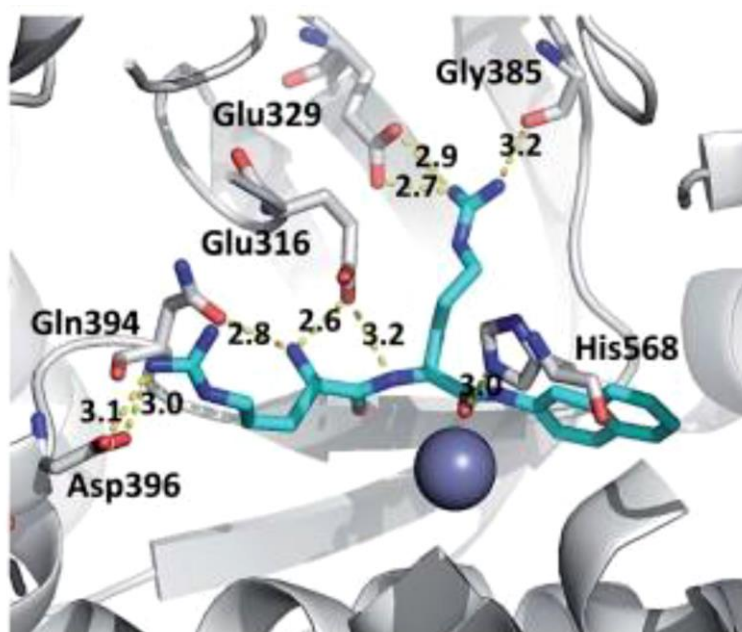
Prema starijoj literaturi smatralo se da se vezanje enzima i supstrata vrši prema modelu „ključa i brave“ odnosno da je aktivno mjesto enzima komplementarno supstratu. Daljnja istraživanja pokazala su da je proces katalize više poput odnosa „ruke i rukavice“ odnosno da se konformacija enzima mijenja tijekom interakcije sa supstratom. Vezanjem supstrata na aktivno mjesto enzima dolazi do njihovih konformacijskih promjena i stvaranja idealnih uvjeta za katalizu. Takav model naziva se model prilagođene prilagodbe (engl. *induced fit*) [48]. Kod peptidaza je specifičnost prema supstratu veoma kompleksna, te je najčešće uvjetovana aminokiselinskim slijedom kao i prostornom orijentacijom aminokiselina u aktivnom mjestu [49].

Na temelju poznate strukture enzima moguće je promotriti način vezanja supstrata za vrijeme katalize i saznati koje aminokiseline sudjeluju u samom mehanizmu. Kod nekih enzimskih reakcija, enzimi mogu promijeniti svoj oblik za vrijeme reakcije. U tim slučajevima korisno je odrediti enzimsku strukturu sa i bez vezanog supstrata.

Kod proučavanja enzimske kinetike ljudske DPP III koristi se komercijalno dostupan supstrat diarginin-2-naftilamid (Arg₂-2NA) jer kao produkt hidrolize nastaje 2-naftilamin koji fluorescira.



Slika 7. Reakcija hidrolize Arg₂-2NA katalizirana sa hDPP III.



Slika 8. Prikaz vezanja supstrata Arg₂-2NA (plavi štapići) u aktivno mjesto hDPP III (sivo) gdje je ion Zn²⁺ označen kao plavo-siva kuglica [50].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

β -merkaptotanol, 20% glukoza, magnezijev klorid (MgCl_2), Luria-Bertani medij (LB medij), ampicilin (Amp), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris), natrijev klorid (NaCl), imidazol, klorovodična kiselina (HCl), izopropil- β -tiogalaktopiranozid (IPTG), akrilamid/bisakrilamid, *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED), amonijev persulfat (APS), natrijev dodecilsulfat (SDS), kobaltov (II) klorid (CoCl_2), Fast Blue B sol (FBB).

3.1.2. Markeri veličine i boje

Za SDS-poliakrilamid gel elektroforezu korištene su boje bromfenol-plavo, Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) i marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Za nativnu elektroforezu korišten je marker *Invitrogen Nativemark*.

3.1.3. Enzimi

PfuUltra DNA polimeraza, restrikcijski enzim *Dpn I*, deoksiribonukleaza I (DnazaI)

3.1.4. Sintetski supstrati

Arginin-arginin-2-naftilamid ($\text{Arg}_2\text{-2NA}$)

3.1.5. Plazmidi i bakterijski sojevi

Plazmidni vektor pLATE31, bakterije XL10-Ultrakompetentna *E. coli*, BL21-CodonPlus (DE3)-RI *E. coli*

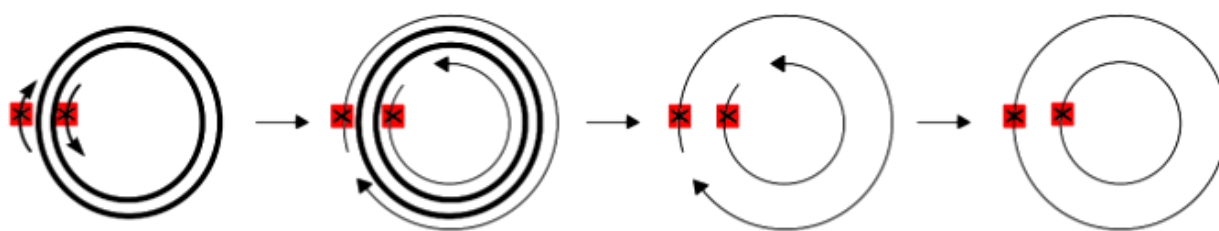
3.1.6. Komercijalni kompleti

Za ciljanu in vitro mutagenezu korišten je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). Za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija korišten je *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.2.1. *In vitro* mutageneza

Ciljana *in vitro* mutageneza je postupak uvođenja mutacija u lanac DNA zamjenom određenih aminokiselina, te brisanjem ili dodavanjem jedne ili više aminokiselina. Kao kalup koristimo plazmidni vektor koji sadrži ciljni gen. Za lančanu reakciju polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) potrebne su dvije oligonukleotidne početnice koje sadrže željenu mutaciju X. Početnice se sljepljuju komplementarno na lanac i produžuju dodatkom DNA polimeraze. Prilikom PCR reakcije, u jednom koraku dolazi do produljenja početnica pomoću plazmida kao kalupa pri čemu nastaju dvije nove molekule DNA koje sadrže ureze. Prinos produkata nije eksponencijalan već linearan zato što novonastali lanci zbog ureza ne mogu poslužiti kao kalup za sljedeći ciklus. Budući da je plazmidna DNA izolirana iz bakterija, ona je metilirana zbog čega se smjesa tretira endonukleazom *Dpn* I koja prepoznaje slijed 5'-Gm⁶ATC-3'. Enzimom će se pocijepati metilirana i hemimetilirana DNA nakon čega će u smjesi ostati samo mutirana DNA. Dobiveni DNA vektor sa urezima se zatim transformira u bakterije *E. coli* (ultrakompetentni soj iz kita XL 10) u kojoj bakterijske ligaze prepoznaje ureze na DNA i sljepljuju krajeve. Kao rezultat nastaje plazmid s ubačenim promijenjenim genima (Slika 9).

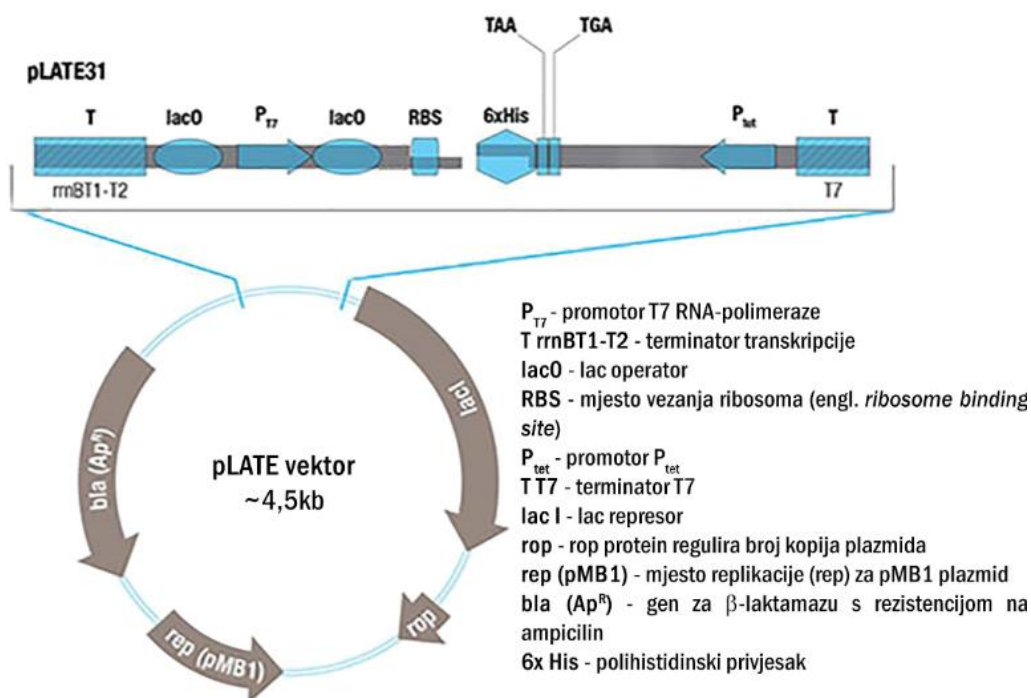


Slika 9. Postupak ciljane *in vitro* mutageneze. Oligonukleotidne početnice su označene strjelicom, mutacija oznakom X, deblja linija predstavlja originalnu nepromijenjenu DNA, a tanka linija novu DNA sa željenom mutacijom. Preuzeto i prilagođeno iz [51].

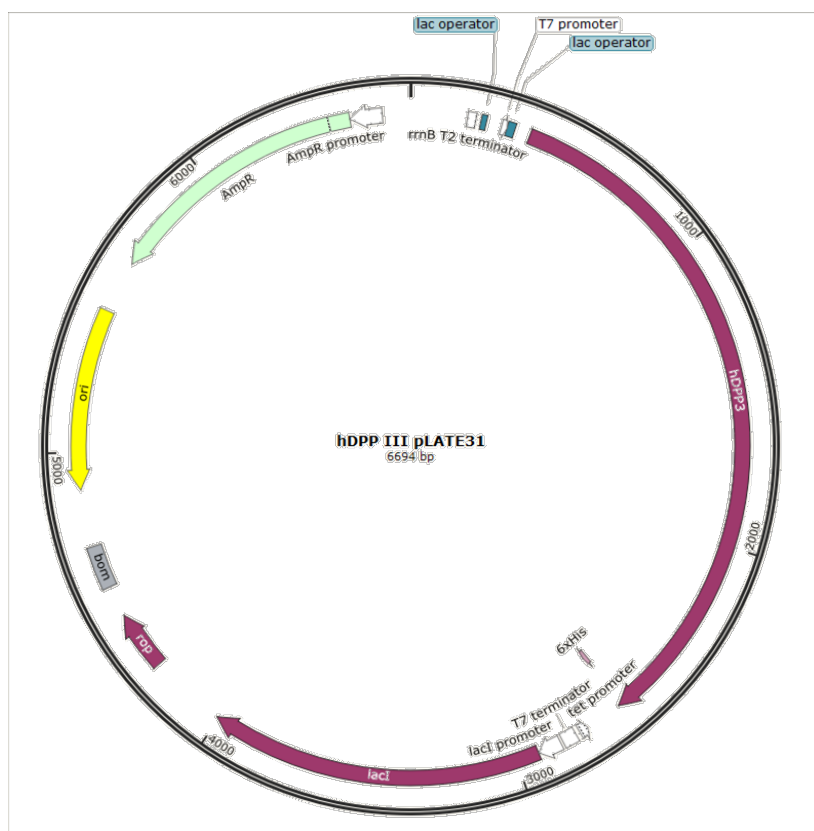
Za prekomjernu ekspresiju proteina hDPP III korišten je vektor pLATE31 (Slika 10). Glavne karakteristike vektora pLATE su visoki prinosi eksprimiranih proteina pod kontrolom T7 promotora i lac operatora, visoka učinkovitost kloniranja i stroga kontrola ekspresije kloniranih gena. pLATE ekspresijski vektor je utemeljen na elementima iz bakteriofaga T7

koji kontroliraju ekspresiju heterolognih gena u *E. coli*. T7 RNA polimeraza specifično prepoznaje T7 promotor. Za ekspresiju se koriste bakterije *E. coli* soj BL21(DE3) ili HMS 174 (DE3) jer je u njima ekspresija T7 RNA polimeraze pod kontrolom lac operatora poput *lacUV5* [52]. Lac represor vezanjem na lac operator potiskuje ekspresiju gena za T7 RNA polimerazu na genomu i gena ugrađenog u pLATE vektor te tada dolazi do vrlo niske razine ekspresije proteina. Dodatkom IPTG-a (izopropil- β -tiogalaktopiranozid) dolazi do konformacijske promjene represora te on disocira s lac operatora čime se omogućuje transkripcija. Bakterijska polimeraza prepoznaje disocijaciju represora, te započinje transkripciju gena za T7-polimerazu. Nastankom T7-polimeraze, ona prepoznaje T7-promotor pored kojeg se nalazi ciljni gen (ugrađen u vektor pLATE), dolazi do njegove transkripcije, a nakon toga i translacije i ekspresije. Nakon nekog vremena bakterijske stanice su bogate željenim proteinom i na taj način je omogućena prekomjerna ekspresija.

Ekspresija bilo kojeg rekombinantnog proteina u *E. coli* može ometati normalnu staničnu funkciju bakterije, te biti toksična za samu bakteriju. Istraživanja su pokazala da je ekspresija T7 RNA polimeraze iz promotora *lacUV5* u lizogenu λ DE3 cureća, te samim time može uzrokovati smrt bakterije. Kako bi se smanjila bazalna ekspresija T7 RNA polimeraze, u vektor pLATE su ugrađeni dodatni elementi. Ti elementi uključuju dva lac operatora koji se nalaze uz T7 promotor i služe kao mjesta vezanja za lac represor (kodiran genom *lacI*), terminator *rrnBT1-T2* (uzvodno od mjesta kloniranja) i slabi Tet promotor (P_{tet}) koji djeluje suprotno od smjera T7 promotora [52].



Slika 10. Konstrukcija ekspresijskog vektora pLATE31. Preuzeto i prilagođeno iz [52].



Slika 11. Prikaz pLATE31 vektora sa ugrađenim genom za hDPP III [53].

Koristeći *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* komplet (Agilent) izvršena je mutageneza za mutante E480Q i T481M. Kod mutanta E480Q je kodon za glutamat (GAG) na poziciji 480 zamijenjen sa glutaminom (CAG) dok je kod mutanta T481M kodon za treonin (ACG) na poziciji 481 zamijenjen metioninom (ATG) [54]. Za potrebe ovog diplomskog rada od proizvođača *MacroGen* su naručene posebno dizajnirane početnice prema preporukama iz kompleta. Nukleotidni slijed početnica prikazan je u tablici 1. Korištena je *PfuUltra HF* (engl. *high fidelity*) DNA polimeraza zbog svoje velike točnosti prilikom sinteze. Posjeduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost odnosno izrezuje krivo ugrađene nukleotide na 3'-kraju lanca kćeri tijekom izvođenja elongacije.

Tablica 1. Nukleotidni slijed dizajniranih početnica za ciljanu *in vitro* mutagenezu. Podebljana i podcrtana slova označuju promijenjene kodone aminokiselina.

E480Q			
Nemutirani slijed	5'-ACAGTGATCAACCCAGAGACGGGCGAGCAG-3'		
T _m / °C	78,6	% GC	63,0
Sekvenca početnice	5'-GTGATCAACCCACAGACGGGCGAGCAG-3'		
Komplementarna	5-CTGCTCGCCCGTCTGTGGGTTGATCAC-3'		
T481M			
Nemutirani slijed	5'-ACAGTGATCAACCCAGAGACGGGCGAGCAG-3'		
T _m / °C	77,4	% GC	55,2
Sekvenca početnice	5'-GATCAACCCAGAGATGGGCGAGCAGATTC-3'		
Komplementarna	5'-GAATCTGCTCGCCCATCTCTGGGTTGATC-3'		

Slijedeći upute proizvođača pripremljena je početna otopina u kojoj je koncentracija početnica iznosila 100 $\mu\text{mol/L}$. Zatim je napravljeno razrjeđenje svake početnice 10x u 100 μL . Prema tablici 2 napravljen je „mastermix“ u kojeg su dodani svi sastojci osim početnica, plazmida i *PfuUltra* polimeraze, te je smjesa centrifugirana. Osnovni volumen je množen faktorom 2,1 jer su potrebne 2 smjese za 2 mutacije. Dobiveni mastermix je zatim podijeljen u dvije reakcijske smjese i dodane su odgovarajuće početnice (engl. *forward* „F“ i *reverse* „R“), zatim plazmid i na kraju enzim *PfuUltra*. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μL . Reakcijska smjesa stavljena je u PCR uređaj i prema programu iz tablice 3 je provedena amplifikacija ($t \sim 3\text{h}$).

Tablica 2. Sastav mastermix otopine za provedbu PCR reakcije, $V_{\text{uk}}=25 \mu\text{L}$.

Reagens	Mutageneza/ μL	Mater mix (x 2,1)/ μL	Negativna kontrola
mQ H ₂ O	14,1	28,8	14,6
10x rxn buffer	2,5	5,25	2,5
dNTP mix	0,5	1,05	0,5
QuikSolution	1,5	3,15	1,5
10 μM primer-F	0,7	-	0,7
10 μM primer-R	0,7	-	0,7
10 ng/ μl plazmid	5	10,5	5
PfuUltra	0,5	-	-

Tablica 3. Ciklički parametri PCR reakcije

Korak	Broj ciklusa	Temperatura / °C	Vrijeme
1	1	95	1'
2	18	95	50"
		60	50"
		68	8'
3	1	68	7'
4	1	4	∞

Nakon završetka PCR reakcije, smjesa je prebačena u plastične epruvete od 1,5 mL, dodano je 0,5 µL restrikcijskog enzima *Dpn* I i inkubirano 1 sat pri 37 °C na termobloku.

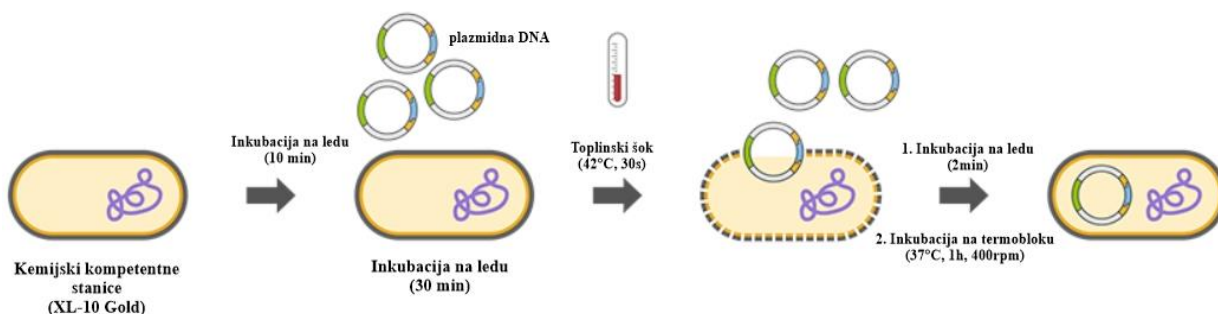
3.3. Metode rada s bakterijama

3.3.1. Kemijska transformacija bakterija XL-10 Gold

Transformacija bakterija je postupak unosa plazmidne DNA u bakteriju. Prema preporukama iz priručnika, za transformaciju su korištene XL-10 Gold ultrakompetentne bakterije *E. coli*. Ti sojevi posjeduju fenotip Hte koji povećava učinkovitost transformacije DNA. Kako bi se dodatno poboljšala kvaliteta plazmidne "miniprep" DNA, XL10-Gold stanice ne posjeduju endonukleaze (*endA1*) i rekombinantno su onesposobljene (*recA*). Mutacija *endA1* poboljšava kvalitetu plazmidne "miniprep" DNA dok mutacija *recA* pomaže osigurati stabilnost umetnute DNA [55].

Budući da imamo dva mutanta, bilo je potrebno 2 x 20 µL bakterija XL-10 Gold. U svaki alikvot XL10-Gold dodano je 0,9 µL β-merkaptioetanol (β-ME), lagano promiješano i inkubirano na ledu 10 minuta. Zatim je dodano po 0,9 µL *Dpn* I-tretiranih amplifikacijskih reakcija, lagano promiješano i inkubirano na ledu 30 minuta. Za rast bakterija koristi se nutritivno bogat LB medij (*Luria Bertani medium*) koji se priprema dodatkom 10 g triptona, 10 g NaCl i 5 g ekstrakta kvasca u 1 L dH₂O nakon čega se otopina autoklavira. Ukoliko se koristi čvrsti LB medij, u otopinu se dodaje još 15 g agara [56]. Za svaku reakciju pripremljeno je po 0,5 mL LB+ medija (0,5 mL LB + 10 µL 20% glukoze + 12,5 µL 0,5 M MgCl₂) i zagrijano na 42 °C na termobloku. Suspenzije bakterijskih stanica su inkubirane 30 sekundi na 42 °C čime su stanice podvrgnute toplinskom šoku (engl. *heat-puls*) nakon čega su prebačene na led u trajanju od 2 minute. Inkubacija na ledu se vrši kako bi se stanice

regenerirale. Nakon toplinskog šoka na stanice je dodan LB+ medij i zatim su inkubirane 1h na 37 °C u termobloku pri 400 rpm (engl. *rotation per minute* - rpm) (Slika 12).



Slika 12. Kemijska transformacija XL-10 Gold ultrakompetentne bakterija *E. coli*. Preuzeto i prilagođeno iz [57].

Nakon inkubacije, 250 μ L suspenzije nasadeno je na hranjive LB ploče koje sadrže antibiotik ampicilin (Amp) i ostavljene su preko noći na 37 °C kako bi narasle bakterijske kolonije. Antibiotik ampicilin koristi se za selekciju transformiranih stanica jer se gen za rezistenciju na ampicilin nalazi ugrađen u vektor pLATE31. Zbog rezistencije preživjeti će samo one bakterijske kolonije koje su transformirane s pLATE31 plazmidom.

3.3.2. Postavljanje prekonoćne bakterijske kulture

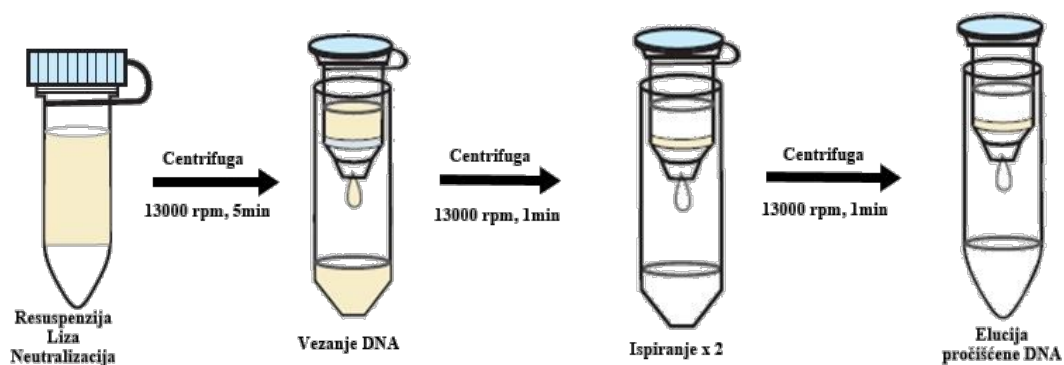
S hranjivih podloga izabrane su zasebne kolonije, te su vrhom nastavka mikropipete prenešene u prethodno pripremljeni LB medij+Amp. Takav proces naziva se inokulacija i vrši se uz sterilne uvjete to jest što bliže plameniku. LB medij za uzgoj pripremljen je u plastičnoj epruveti od 50 mL tako da je dodano 10 mL LB medija i 10 μ L ampicilina. Plastične epruvete stavljenе su u tresilicu na 37 °C i 190 rpm za prekonoćni uzgoj.

3.3.3. Izolacija i pročišćavanje plazmida

Prekonoćna kultura centrifugirana je na 3850 x g u vremenu od 4 minute, te je supernatant odliven. Za daljnji postupak izolacije plazmida praćen je protokol *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* proizvođača Thermo Scientific. Pročišćavanje je odrađeno na sobnoj temperaturi, a brzina centrifuge iznosila je 13000 rpm.

Talog koji sadrži bakterijske stanice resuspendiran je u 250 μ L otopine za resuspendiranje (engl. *resuspension solution*), zatim je prebačen u plastične epruvete od 2 mL i kratko

vorteksiran. Dodano je 250 μL otopine za lizu stanica (engl. *lysis solution*), te je promiješano okretanjem plastične epruvete 5-6 puta dok otopina nije postala bistra. U ovom koraku, stanice su podvrgnute alkalnoj lizi uz pomoć SDS detergenta koji narušava strukturu stanične membrane kako bi se oslobodila plazmidna DNA. Liza stanica ne smije trajati dulje od 5 minuta. Nastali lizat je neutraliziran dodatkom 350 μL neutralizacijske otopine (engl. *neutralization solution*), te ponovno lagano promiješan okretanjem 5-6 puta. Neutralizirani bakterijski lizati odvajaju se u zamućenom obliku. Stanice i SDS precipitat odvojeni su centrifugiranjem u trajanju od 5 min, te je supernatant prebačen u kolonice *GeneJET* i centrifugiran 1 min. Kako bi se adsorbirana DNA očistila od kontaminacija, isprana je dodatkom 500 μL otopine za ispiranje (engl. *wash solution*) i centrifugirana 1 minutu. Otopina koja je prošla kroz kolonice (engl. *flow-through*) je bačena i ponovljen je prethodni postupak dodatkom 500 μL otopine za ispiranje. *Flow-through* je ponovno bačen, te je kolonica centrifugirana dodatnih 1 minutu kako bi se uklonili ostaci otopine za ispiranje. *GeneJET Spin* kolonica prebačena je u novu plastičnu epruvetu od 1,5 mL, te je dodano 50 μL elucijskog pufera (engl. *elution buffer*; 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) točno na sredinu membrane kako bi se eluirala plazmidna DNA. Smjesa je inkubirana 2 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je centrifugirana 2 min (Slika 13).



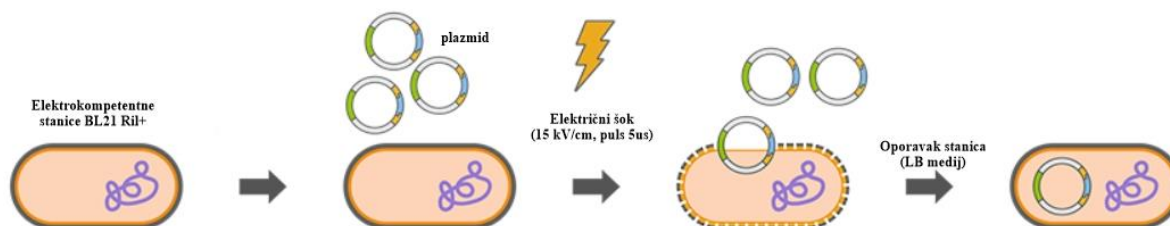
Slika 13. Postupak izolacije rekombinantnog plazmida korištenjem *TS Miniprep kit*. Preuzeto i prilagođeno iz [58].

Pročišćena plazmidna DNA eluirana je u epruvetu od 1,5 mL, te je njezina koncentracija određena korištenjem mikrovolumnog spektrofotometra *BioDrop*. Kako bi se provjerila uspješnost mutagenese, po 9,5 μL svakog plazmida uz dodatak 0,5 μL LicR primera je poslano na sekvenciranje (*Macrogen*). Preostala pročišćena plazmidna DNA uskladištena je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati sekvenciranja potvrdili su uspješnost obje mutacije.

3.3.4. Fizikalna transformacija bakterija BL21-CodonPlus (DE3)-RIL

Nakon što je potvrđena uspješna mutacija plazmida, izvršena je fizikalna transformacija elektrokompetentnih BL21-CodonPlus (DE3)-RIL bakterija *E. coli*. Metoda koja je korištena je elektroporacija u kojoj se stanice podvrgavaju električnom polju kako bi se povećala propusnost stanične membrane i omogućio unos plazmida.

Postupak elektroporacije izvršen je na ledu, te je transformiran „divlji“ tip hDPP III i mutanti hDPP III-E480Q i hDPP III-T481M. S -80 °C uzeta su tri alikvota bakterijskih stanica BL21-CodonPlus (DE3)-RIL od 20 µL. U svaku plastičnu epruvetu dodan je 1 µL odgovarajućeg plazmida, promiješano nastavkom mikropipete, te je smjesa prebačena u kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija je izvršena podvrgavanjem stanica kratkim električnim šokovima od 5 µs. Na stanice je odmah nakon elektroporacije dodan zagrijani LB medij na 37 °C i smjesa je promiješana (Slika 14). Zatim je prebačena u plastičnu epruvetu od 1,5 mL, te stavljena na inkubaciju na termoblok pri 37 °C uz trešnju od 300 rpm u vremenu od 1 h. Nakon toga, 100 µL stanica naciepljeno je na čvrste hranjive podloge LB+Amp i ostavljeno preko noći na 37 °C.

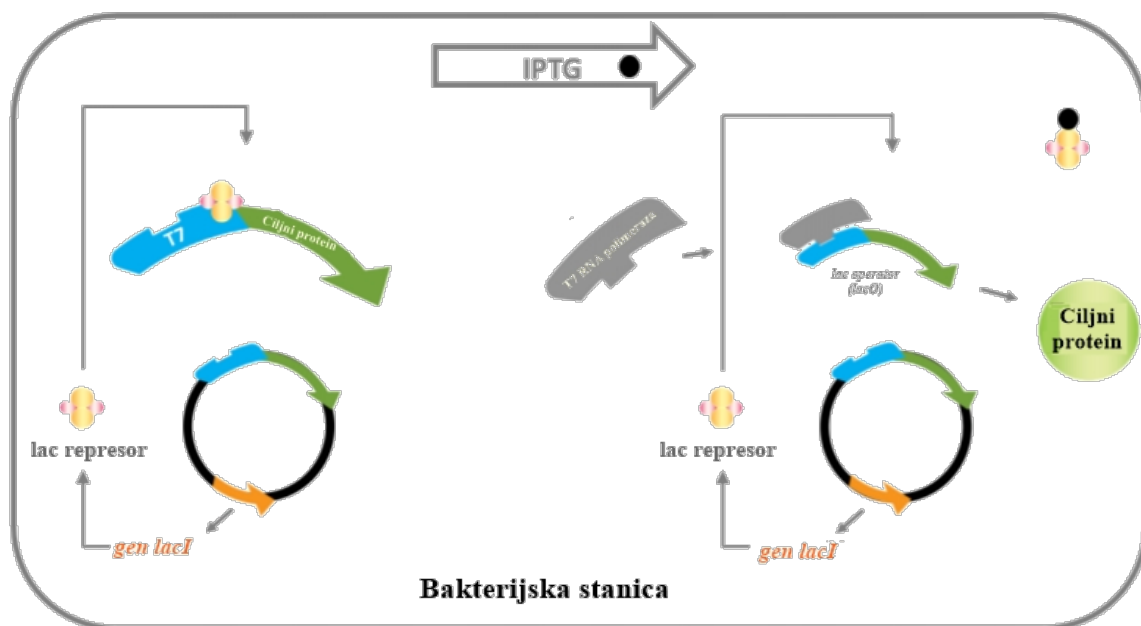


Slika 14. Fizikalna transformacija bakterijskih stanica BL21-CodonPlus (DE3)-RIL plazmidom hDPP III. Preuzeto i prilagođeno iz [57].

3.3.5. Uzgoj prekonoćne bakterijske kulture i kulture za ekspresiju proteina

Na hranjivim podlogama narasle su bakterijske kolonije, te su izabrane zasebne kolonije za postav prekonoćne bakterijske kulture. U plastične epruvete od 50 mL dodano je 12 mL LB medija i 12 µL antibiotika ampicilina ($c = 100$ mg/mL). U sterilnim uvjetima, odnosno što bliže plameniku, vrhom nastavka mikropipete odstrugane su po dvije zasebne bakterijske kolonije i prebačene zajedno s nastavkom u plastičnu epruvetu. Čep plastične epruvete nije zatvoren do kraja kako bi moglo ulaziti nešto zraka u nju. Tako pripremljene su stavljene na tresilicu preko noći uz temperaturu od 37 °C i okretaje 250 rpm.

Za postav kulture za ekspresiju proteina pripremljena je Erlenmeyerova tikvica od 2 L u koju je dodano 0,5 L LB medija i 500 μL Amp, te 10 mL prekonoćne bakterijske kulture od dana prije. Erlenmeyerova tikvica stavljena je na tresilicu na 37°C i 300 rpm. Kultura za ekspresiju proteina uzgaja se do $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ za što je potrebno približno 90 minuta. OD_{600} označava optičku gustoću uzorka pri valnoj duljini od 600 nm. Mjerenje se vrši koristeći mikrovolumni spektrofotometar *BioDrop*, te kada OD_{600} dostigne vrijednost približno 0,6 to označava da su bakterijske stanice dosegle logaritamsku fazu rasta. Kao slijepa proba prilikom mjerenja korišten je LB medij+Amp. Nakon što su stanice dostigle željenu vrijednost ohlađene su 30 minuta na 10 °C. Zatim je dodano u svaku Erlenmeyerovu tikvicu po 125 μL 1M IPTG-a za indukciju i stavljene su na prekonoćnu ekspresiju u tresilici na 18 °C i 130 rpm. Dodatkom IPTG-a omogućuje se početak ekspresije ciljnog proteina (Slika 15).

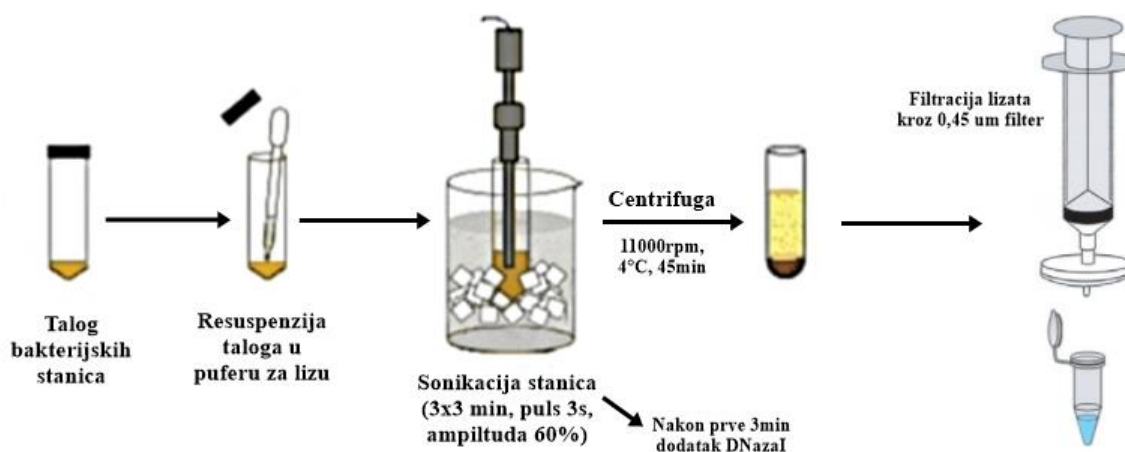


Slika 15. IPTG indukcija ekspresije proteina. Preuzeto i prilagođeno iz [59].

3.3.6. Liza i sonikacija bakterijskih stanica

Prekonoćne ekspresijske kulture prebačene su u posebne prozirne bočice od 250 mL do 2/3 volumena i tarirane. Centrifugirane su u centrifugi Sorval RC-5B pri 6000 rpm u vremenu od 15 min. Supernatant je odliven, a talog je prebačen u plastične epruvete od 50 mL i smrznut na -20 °C. Epruvete su spremljene naopačke kako bi se iscjedio višak tekućine. Dobiveni talog koristio se za daljnju analizu i izolaciju proteina.

Prethodno odvojeni i smrznuti talog je resuspendiran u 20 mL pufera za lizu i stavljen na led. Zatim je izvršena sonikacija 3 x 3 min s pulsevima od 3 s i amplitude 60%. Nakon prvih 3 min dodano je 10 µL enzima *DNazaI*, te je nastavljeno sa sonikacijom. Nakon sonikacije, smjesa poprima prljavu sivu boju, te je tarirana i centrifugirana u centrifugi Sorval RC-5B 45 min na 11000 rpm pri temperaturi od 4 °C. Supernatant (lizat) je profiltriran kroz filter sa promjerom pore 0,45 µm kako bi se uklonili stanični ostaci, a dobiveni filtrat nanesen je na kolonu za daljnje pročišćavanje (Slika 16).



Slika 16. Postupak lize i sonikacije bakterijskih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz [60, 61].

3.4. Metode rada s proteinima

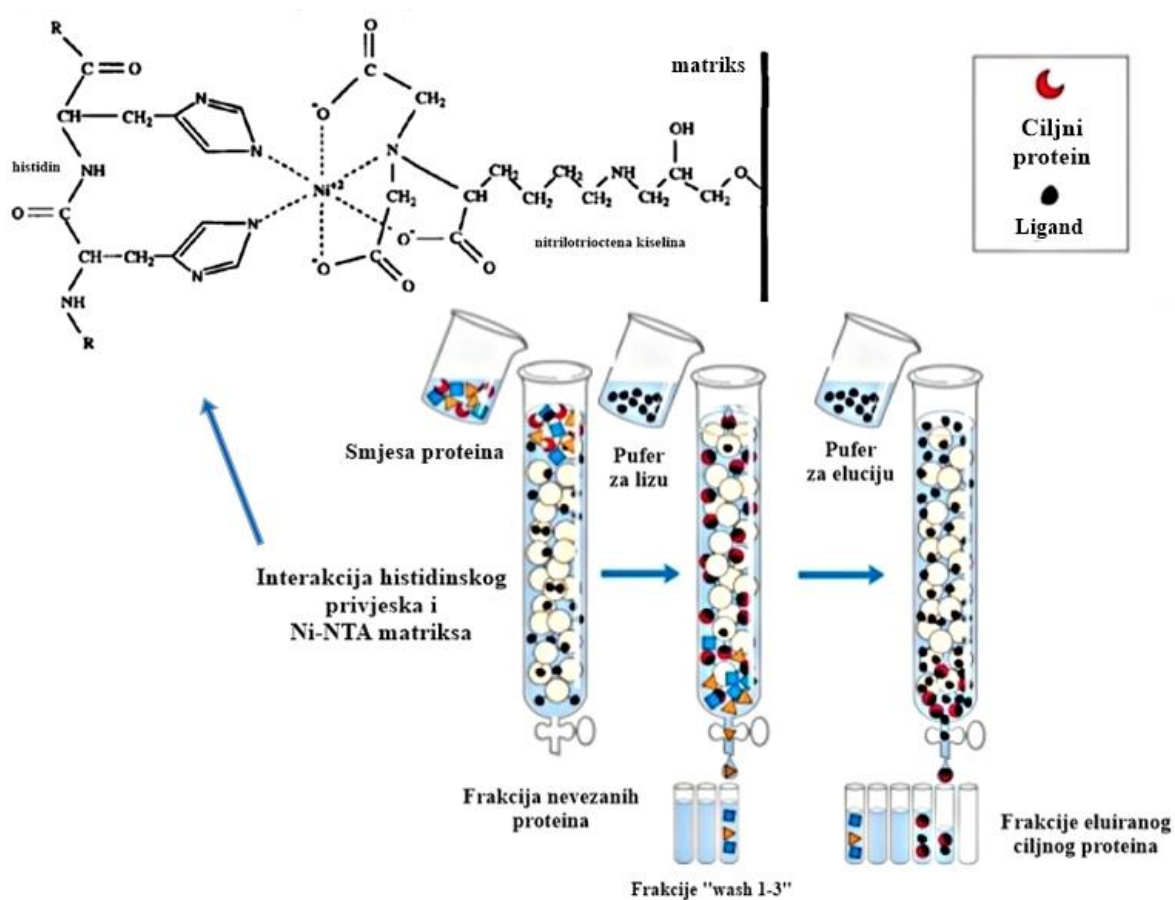
3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom

Za daljnje pročišćavanje proteina korištena je metoda afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionom (IMAC) koja se temelji na interakciji histidinskih ostataka s metalnim ionom koji je imobiliziran unutar punila za kromatografiju na stupcu. Kromatografsko punilo korišteno u ovom diplomskom radu je Ni-NTA u kojem nitrilotrioctena kiselina (NTA) okupira 4 od 6 koordinacijskih veznih mjesta iona nikla. Iza slijeda za ciljni protein nalazi se 5-6 uzastopnih histidina koji predstavljaju histidinski privjesak (His privjesak). Nakon ekspresije, histidini su dio proteina, te se takav protein koji sadrži His privjesak naziva fuzijski protein. Histidinski privjesak se preko funkcionalne skupine imidazola veže za dvovalentni metalni ion Ni^{2+} prilikom čega se stvara kompleks. Dodatkom pufera koji sadrži visoku koncentraciju imidazola dolazi do otpuštanja proteina zbog kompeticije slobodnog imidazola s imidazolnim skupinama histidina [51].

Pripremljeni su potrebni puferi za pročišćavanje čiji se sastav nalazi u tablici 4. Pročišćena su sva tri proteina odnosno „divlji“ tip hDPP III i mutanti E480Q i T481M. Prilikom nanošenja uzorka treba paziti da se ne pomakne površinski matriks kolone, isto tako kolona ne smije ostati suha i sljedeća otopina mora biti dodana na vrijeme. Ukoliko se matriks u koloni osuši neće više moći vezati histidinski privjesak. Kolona je prvo isprana sa 2 x 5 mL mQ vode, te ekvilibrirana sa 2 x 5 mL pufera za lizu. Za regulaciju protoka korištena je peristaltička pumpa s brzinom protoka od 0,5 mL/min za nanošenje uzorka i 1 mL/min za ispiranje i eluciju. Nakon toga nanesen je proteinski ekstrakt (lizat) dobiven liziranjem stanica u volumenima po ~ 3 mL pri najmanjoj brzini protoka, te je sakupljena frakcija nevezanih proteina (engl. *flow through*-FT). Zatim je kolona isprana sa 3 x 2 mL pufera za lizu i prikupljene su frakcije W1-3 (engl. *wash*, W) Fuzijski protein sa His privjeskom eluiran je dodatkom po 3 mL elucijskog pufera sve dok ne izađe sav protein (Slika 17). Frakcije su prikupljene u volumenima od ~0,5 mL i označene kao E_n gdje n predstavlja broj frakcije. Nakon ovog postupka fuzijski protein je pročišćen, te je izvršeno konačno ispiranje dodatkom 5 mL završnog pufera (engl. *EndWash buffer*) nakon čega su kolone isprane još sa 20 mL mQ vode i 10 mL 20% etanola. Koncentracije frakcija izmjerene su na uređaju *BioDrop*, a kao slijepa proba korišten je elucijski pufer.

Tablica 4. Sastav pufera za afinitetnu kromatografiju s imobiliziranim metalnim ionom

Pufer za lizu	50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH=8.0
Elucijski pufer	50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH=8.0
Završni pufer	50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=8.0

**Slika 17.** Postupak pročišćavanja proteina metodom afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionom na Ni-NTA koloni. Preuzeto i prilagođeno iz [62, 63].

3.4.2. Analiza proteina SDS-poliakrilamid gel elektroforezom

Kako bismo utvrdili učinkovitost provedenog purifikacijskog postupka izvršena je elektroforeza u SDS-poliakrilamid gelu. Elektroforeza je proces gibanja molekula s neto nabojem u električnom polju. Poliakrilamidni gel djeluje poput sita i odvaja molekule na temelju molekularne mase. Manje molekule će se kretati brže dok će veće molekule biti sporije to jest njihova elektroforetska pokretljivost je manja. Smjer kretanja molekula je od vrha prema dolje odnosno od katode (-) prema anodi (+). Dodatkom natijeva dodecil-sulfata (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) u smjesu proteina razaraju se gotove sve nekovalentne interakcije u nativnom proteinu. Nastaje kompleks SDS-protein u omjeru jedan anion SDS-a na dva aminokiselinska ostatka čiji je negativni naboj proporcionalan masi proteina. U smjesu proteina dodaje se i β -merkaptetanol kako bi se reducirale disulfidne veze. Nakon završetka elektroforeze, gel se oboja bojom poput *Comassie blue* kako bi se vizualizirali proteini nastankom vrpca. [45]

Poliakrilamidni gelovi su pogodni za elektroforezu jer su kemijski inertni, a lako se dobivaju polimerizacijom akrilamida. Gel za SDS elektroforezu sastoji se od dva gela, a to su gel za sabijanje i gel za razdvajanje koji se razlikuju prema veličini pora i pH vrijednosti. Sastav pripremljenih gelova nalazi se u tablici 5.

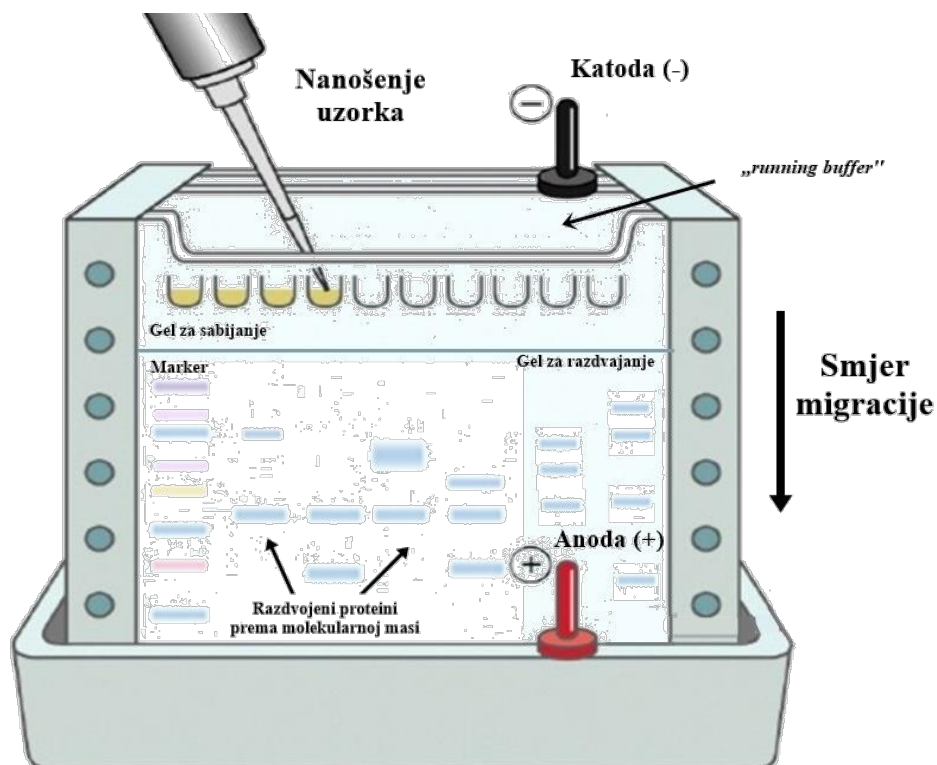
Tablica 5. Sastav poliakrilamidnih gelova za SDS-gel-elektroforezu

Gel za razdvajanje 10 % (pH=8,8)		Gel za sabijanje 5% (pH=6,8)	
mQ H ₂ O	6 mL	mQ H ₂ O	5,4 mL
1,5 M Tris pH=8,8	3,76 mL	0,5 M Tris pH=6,8	1 mL
30% akrilamid	4,95 mL	30% akrilamid	1,34 mL
10% SDS	150 μ L	10% SDS	80 μ L
10% APS	150 μ L	10% APS	80 μ L
TEMED	12 μ L	TEMED	16 μ L

Kako bi se osigurala optimalna reakcija proteina sa SDS-om uzorci se pripremaju zagrijavanjem u odgovarajućem puferu. Pripremljeni su tako da je za svaki uzorak uzeto 1-2 μ L proteinskog uzorka, te dodano mQ vode do 5 μ L. U svaki uzorak zatim je dodano 5 μ L pufera za nanošenje na gel (0,125 Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 2% β -

merkaptoetanol, 0,03 mM bromfenol plavo) tako da ukupni volumen iznosi 10 μ L. Nakon toga, uzorci su kratko centrifugirani i zagrijani u termobloku na 96 °C u vremenu od 15 min.

Unaprijed pripremljeni gelovi namješteni su u kadicu za elektroforezu i dodan je *running buffer* (u 1 L dH₂O: 3,0275 g Tris, 14,41 g glicin i 1,0 g SDS). U jažice za uzorke nanešeni su pripremljeni uzorci u volumenu od 10 μ L i 5 μ L markera *PageRuler Prestained Protein Ladder*. Pokrenuta je elektroforeza pri naponu od 100 V u vremenu od ~15 min odnosno dok uzorci nisu stigli do linije gela za razdvajanje, nakon čega je pojačano na 120 V na vrijeme od ~1 h (Slika 18). Kada je elektroforeza završila, gel je obojan bojom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) tako da je uronjen u plastičnu kadicu u kojoj se nalazi CBB, te stavljen na vodenu kupelj pri 50 °C u vremenu od 15 min. Gel je kasnije ispran vodom i odbojan odbojivačem (MeOH:HAc:H₂O=3:1:6).

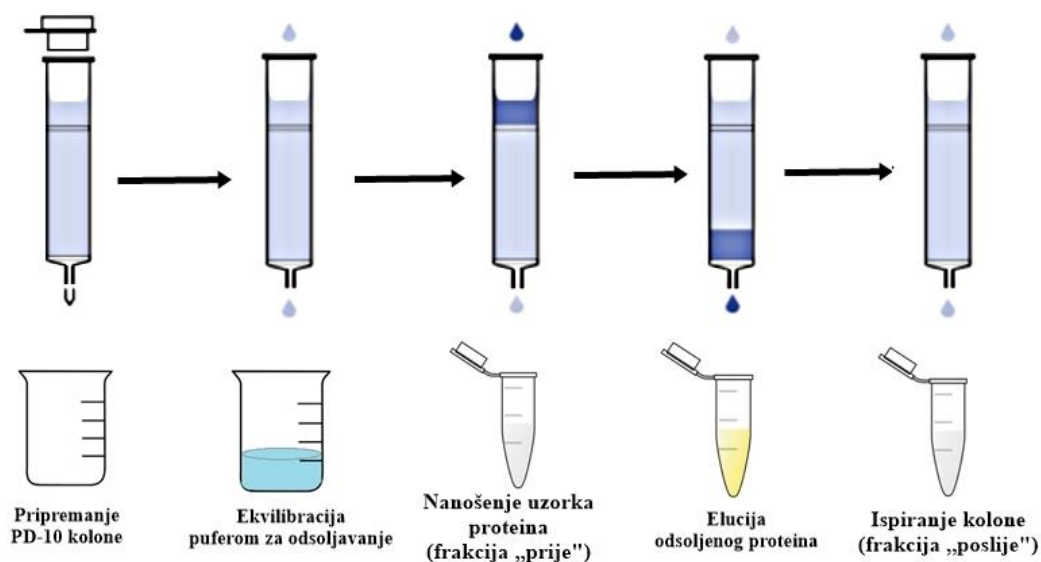


Slika 18. Princip izvođenja SDS-poliakrilamid gel-elektroforeze. Preuzeto i prilagođeno iz [64].

3.4.3. Odsoljavanje proteina na PD-10 koloni

Kako bi se uklonila visoka koncentracija imidazola u uzorku proteina nakon purifikacije izvršeno je odsoljavanje proteina na PD-10 koloni (*GE Healthcare*). Unutar PD-10 kolone nalazi se Sephadex G-25 matriks koji omogućuje razdvajanje tvari na osnovi razlike u molekulskoj masi. Takva kromatografska tehnika naziva se gel filtracija. Molekule veće od pora matriksa će se eluirati prve dok će manje molekule zaostajati u porama matriksa. Odsoljavanje se može izvršiti na dva načina odnosno upotrebom gravitacijske sile ili centrifugalne sile [65].

Kolone su prvo isprane sa 25 mL mQ vode, a zatim su ekvilibrirane dodatkom 25 mL pufera za odsoljavanje (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH=7,5). Tekućina je izlazila iz kolone pod utjecajem gravitacijske sile. Nakon što je izašao sav pufer, nanoseno je 2,5 mL proteina i skupljena je frakcija „prije“ (engl. *flow-through*). Zatim je odsoljeni protein eluiran dodatkom 3,5 mL pufera za odsoljavanje i skupljena je frakcija odsoljenog proteina. Kolona je nakon toga isprana dodatkom još 3,5 mL pufera za odsoljavanje i skupljena je frakcija „poslije“ (Slika 19). Budući da se PD-10 kolone mogu koristiti više puta, kolone su isprane sa 25 mL mQ vode i 10 mL 20% etanola. Na uređaju *BioDrop* izmjerene su koncentracije svih frakcija.



Slika 19. Princip odsoljavanja proteina na PD-10 kolonama. Preuzeto i prilagođeno iz [65].

3.5. Biokemijska karakterizacija proteina

3.5.1. Nativna gel elektroforeza

Ukoliko je potrebno sačuvati interakcije između proteinskih domena i njihovu nativnu konformaciju koristi se nativna elektroforeza. Moguće je ispitati vežu li se određeni proteini i tako analizirati biološku aktivnost proteina. Za razliku od SDS gel elektroforeze, u nativnoj elektroforezi se ne koriste denaturirajući uvjeti odnosno detergent SDS, a migracija proteina ovisi o njihovom naboju, masi i strukturi. Elektroforetska pokretljivost nastaje jer većina proteina ima negativni neto naboj u alkalnim puferima, te će one molekule sa većim negativnim nabojem brže migrirati. Sila trenja gela ima učinak prosijavanja odnosno regulira kretanje proteina prema njihovoj veličini i trodimenzionalnom obliku [66].

Analiza nativnom elektroforezom korištena je kako bi se ispitalo vezanje „divljeg“ tipa hDPP III kao i dobivenih mutanata E480Q i T481M s Kelch domenom proteina Keap1. Korišten je uređaj *Pharmacia PhastSystem Separation and Control Unit* i odgovarajući poliakrilamidni gel *PhastGel Homogeneous 20%*. Na gel su nanešeni maleni volumeni uzoraka (~5 µL) u koje je dodana boja bromfenol plavo. Nativna elektroforeza odvija se u tri koraka, a vrijeme odvajanja mjeri se u volt-satima (Vh). Elektroforeza je pokrenuta pri naponu od 400 V, snazi 2 W i temperaturi od 15 °C dok su vrijeme i jakost struje različiti ovisno o koracima. U prvom koraku stvara se pokretna granica koja započinje migrirati kroz gel, a odvija se pri jakosti struje 10 mA u vremenu od 10 Vh. U drugom koraku smanjuje se struja na 1 mA i započinje migracija uzoraka u gel, potrebno vrijeme je 2 Vh. U trećem koraku podiže se struja na 10 mA i proteini se odvajaju prema veličini i naboju u vremenu od 170 Vh. Elektroforeza je završena kada bromfenol plavo dodirne granicu anodnog pufera.

Nanešeni su uzorci Kelch domene zasebno, svakog proteina zasebno te kombinacije Kelch domene i proteina. Na gel su uzorci nanášeni u omjerima 1:1 i 1:2 (hDPP III:Kelch).

3.5.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, engl. *Dynamic Light Scattering*) je fizikalna metoda koja se koristi za određivanje distribucije veličina malih čestica u suspenziji. Upotrebom metode može se izračunati koeficijent difuzije kao i hidrodinamički radijus koji ovise o veličini i obliku makromolekula. Uzorak se izlaže monokromatskom valu svjetlosti, raspršena svjetlost zatim prolazi kroz drugi polarizator gdje se skuplja fotomultiplier, a dobivena slika projicira se na zaslone. Kada monokromatski val svjetlosti dođe do otopine koja sadrži makromolekule, svjetlost se raspršuje u svim smjerovima kao funkcija veličine i oblika makromolekula. Intenzitet raspršenog svjetla daje informacije o molekularnoj masi i radijusu makromolekule [67].

Ova metoda analize korištena je kako bismo dodatno utvrdili vezanje proteina s Kelch domenom. Dinamičko raspršenje svjetlosti mjereno je na uređaju *Zetasizer Nano series* u vremenu od 15 minuta za svaki uzorak. Volumen uzorka iznosio je 70 μL , te su izmjereni uzorci enzima zasebno („divlji“ tip hDPP III, E480Q i T481M) i u kombinaciji sa Kelch domenom u omjeru 1:1.

3.5.3. Test specifične aktivnosti enzima

Za određivanje specifične aktivnosti enzima korišten je sintetski supstrat diarginil-2-naftilamin budući da dipeptidil peptidaza III pokazuje visoku specifičnost prema njemu. Test se bazira na nastanku fluorescentnog 2-naftilamina (2NA) nakon djelovanja enzima na supstrat. Budući da je nastali produkt humani kancerogen uklanja se reakcijom diazokopulacije sa soli *Fast Blue B* (FBB). Diazokopulacija (engl. *diazo coupling*) je reakcija elektrofilne aromatske supstitucije aktiviranih derivata benzena sa diazonijevim elektrofilima pri čemu nastaju obojeni aromatski azo spojevi [68]. Nastali produkt nakon diazokopulacije sa FBB soli daje ružičasto obojenje i detektira se spektrofotometrijski.

Reakcija je mjerena u triplicatima za sva tri enzima koristeći volumene enzima od 3 i 10 μL što ukupno čini 18 reakcija i jedna slijepa proba. U slijepu probu nije dodan enzim. Korištene su dvije koncentracije enzima $c=0,01 \text{ mg/mL}$ i $c=0,001 \text{ mg/mL}$. Razrjeđenja su napravljena koristeći pufer 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH=7,5. FBB sol pripremljena je prije početka pipetiranja otapanjem 12,7 mg soli u 8,46 mL pufera za FBB sol i spremljena na -20°C do korištenja. Redoslijed pipetiranja kao i volumeni reagensa prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Redoslijed, volumeni i koncentracije dodanih reagensa za određivanje specifične aktivnosti enzima.

Reagens	Slijepa proba	$c(\text{enzim}) = 0,01$ mg/mL	$c(\text{enzim})=0,001$ mg/mL
Pufer za test aktivnosti			
(0,1 M Tris, pH=8,6) / μL	500	500	500
mQ H ₂ O / μL	435	432	425
5 mM CoCl ₂ / μL	15	15	15
Enzim / μL	-	3	10
Inkubacija 2 minute na 37 °C			
0,3 mM Arg ₂ -2NA / μL	50	50	50
Vrijeme reakcije 15 minuta na 37 °C			
FBB sol / μL	200	200	200

Nakon dodatka enzima, smjesa je inkubirana 2 min na 37 °C u vodenoj kupelji. Dodatkom supstrata Arg₂-2NA u prvu epruvetu započeto je mjerenje vremena od 15 min, te se svakih 15 sekundi dodao supstrat u sljedeću epruvetu kako bi u svakoj epruveti reakcija trajala točno 15 min. Reakcija je prekinuta nakon isteka 15 min dodatkom FBB soli istim redoslijedom kao i na početku reakcije, epruveta je izvađena iz vodene kupelji, dodana je FBB sol nakon čega je smjesa promiješana i ostavljena vani. Reakcijska smjesa ostavljena je na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega je očitana apsorbancija pri 530 nm koristeći *BioDrop* uređaj koji je najprije anuliran slijepom probom. Korištenjem jednadžbe 2 izračunata je aktivnost enzima ($\Delta A_{530} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) dok je množenjem dobivene vrijednosti sa 47,9 (određeno iz β-NA standardne krivulje) dobivena specifična aktivnost u $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

$$\text{Aktivnost}(\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ml}) = \frac{\Delta A_{530} * 1000}{V_{\text{uzorka}}(\mu\text{L}) * t(\text{min}) * c\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \quad (2)$$

3.5.4. Mjerenje enzimske kinetike

Za mjerenje enzimske kinetike korišten je sintetski supstrat Arg₂-2NA. Djelovanjem enzima hDPP III na supstrat nastaje produkt 2-naftilamin koji fluorescira. Primjenom Beer-Lambertovog zakona moguće je pratiti promjenu intenziteta fluorescencije s promjenom koncentracije produkta u vremenu.

Kinetička mjerenja provedena su na fluorescentnom spektrofotometru *Cary Eclipse (Varian)*, te su postavljene odgovarajuće postavke za mjerenje. Ekscitacijska valna duljina iznosila je 332 nm uz širinu otvora pukotine 10 nm, a emisijska valna duljina 420 nm uz širinu otvora pukotine 5 nm. Temperatura prilikom mjerenja iznosila je 25 °C, a vrijeme mjerenja 1 min. Prema tablici 7 pripremljena je reakcijska smjesa sa različitim koncentracijama supstrata. Volumen dodanog enzima u svakom mjerenju iznosio je 10 µL, te je dodan zadnji. Prije dodatka enzima, smjesa je lagano promiješana okretanjem i temperirana 2 min u uređaju. Nakon isteka vremena, dodan je enzim, kiveta je 2 puta okrenuta kako bi se smjesa promiješala i započeto je mjerenje. Množinske koncentracije enzima za „divlji“ tip hDPP III i mutant E480Q iznosile su 0,02 µmol dm⁻³, a za mutant T481M 0,05 µmol dm⁻³. Razrjeđenja enzima napravljena su u puferu 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH=7,5. Dobiveni rezultati obrađeni su koristeći programe *Microsoft Office Excel* i *GraphPad Prism*.

Tablica 7. Volumeni i koncentracije reaktanata dodanih u reakcijsku smjesu za mjerenje enzimske kinetike, V_{UK}= 3 mL.

	[S] u reakciji / µM	mQ H ₂ O / µL	0,1 M Tris HCl, pH=8,6 / µL	5 mM CoCl ₂ / µL	0,8 mM Arg ₂ - 2NA / µL
1	2,5	1400,6	1500	30	9,4
2	5	1441,25	1500	30	18,75
3	10	1442,5	1500	30	37,5,
4	15	1403,75	1500	30	56,25
5	20	1385	1500	30	75
6	25	1366,26	1500	30	93,75
7	30	1347,5	1500	30	112,5
8	35	1328,75	1500	30	131,25
9	40	1310	1500	30	150

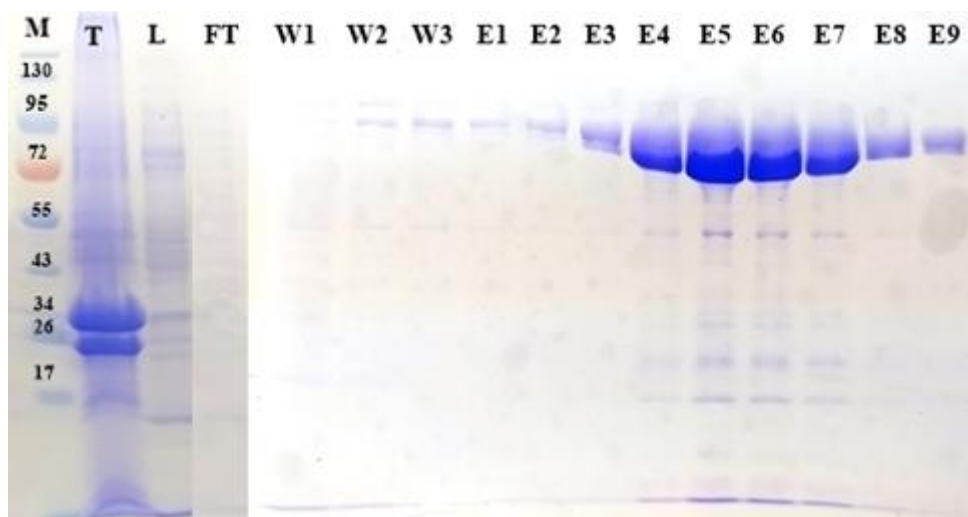
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza pročišćavanja proteina

Rezultati ciljne mutageneze provjereni su sekvenciranjem (*Macrogen*) koje je potvrdilo uspješnost mutacija određenih aminokiselina. Nakon provedene ekspresije i lize bakterijskih stanica, iz dobivenog supernatanta izolirani su i pročišćeni enzimi hDPP III. Pročišćavanje sva tri enzima („divlji“ tip i dva mutanta) provedeno je afinitetnom kromatografijom sa imobiliziranim metalnim ionom na koloni Ni-NTA nakon čega je efikasnost pročišćavanja provjerena SDS-poliakrilamid gel elektroforezom.

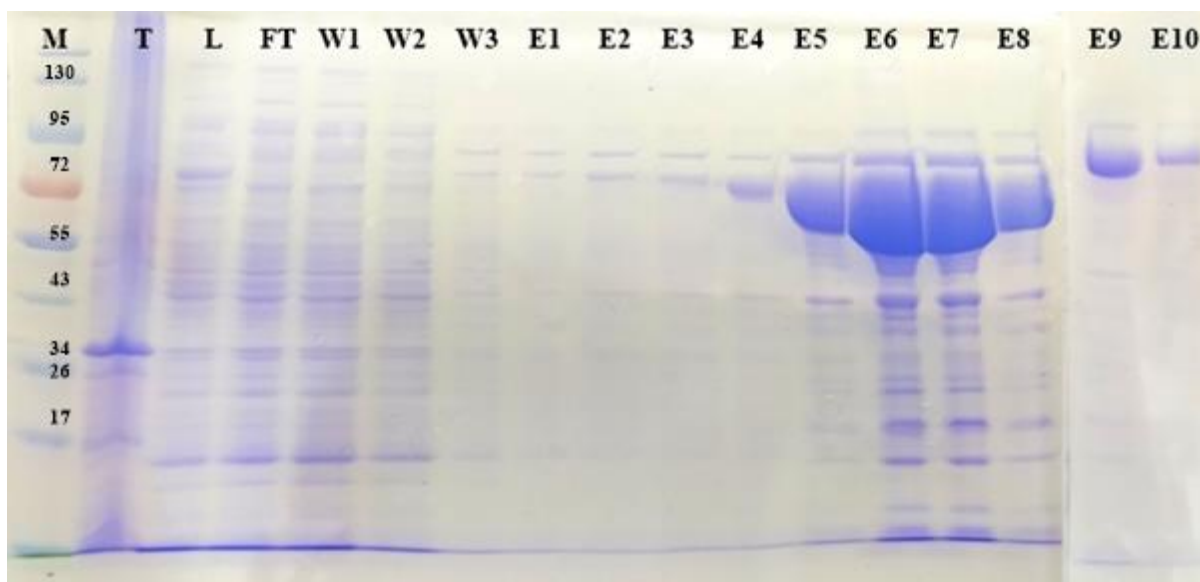
Na gelove su nanošeni uzorci taloga nakon sonikacije, stanični lizat, nevezana frakcija, uzorci ispiranja te uzorci elucije. Rezultati SDS- poliakrilamid gel elektroforeze pokazuju da su ekspresija i pročišćavanje za sva tri ciljna proteina bili uspješni. Kao marker je korišten *PageRuler Prestained Protein Ladder* s rasponom veličine fragmenta 25 - 180 kDa. Kod svih enzima vidljivo je da se najintenzivnija vrpca nalazi između crvene vrpce markera koja iznosi 72 kDa i plave vrpce markera koja iznosi 95 kDa što odgovara molekulskoj masi hDPP III koja iznosi 80 - 85 kDa.

Na slici 20 prikazani su dobiveni rezultati elektroforeze „divljeg“ tipa hDPP III. Analizom gela vidljivo je da je ciljni protein uspješno pročišćen. Frakcije proteina E4-E8 pokazale su najveću čistoću i količinu proteina, te su spojene ($V_{UK}=2,6$ mL) i korištene za daljnje pročišćavanje.



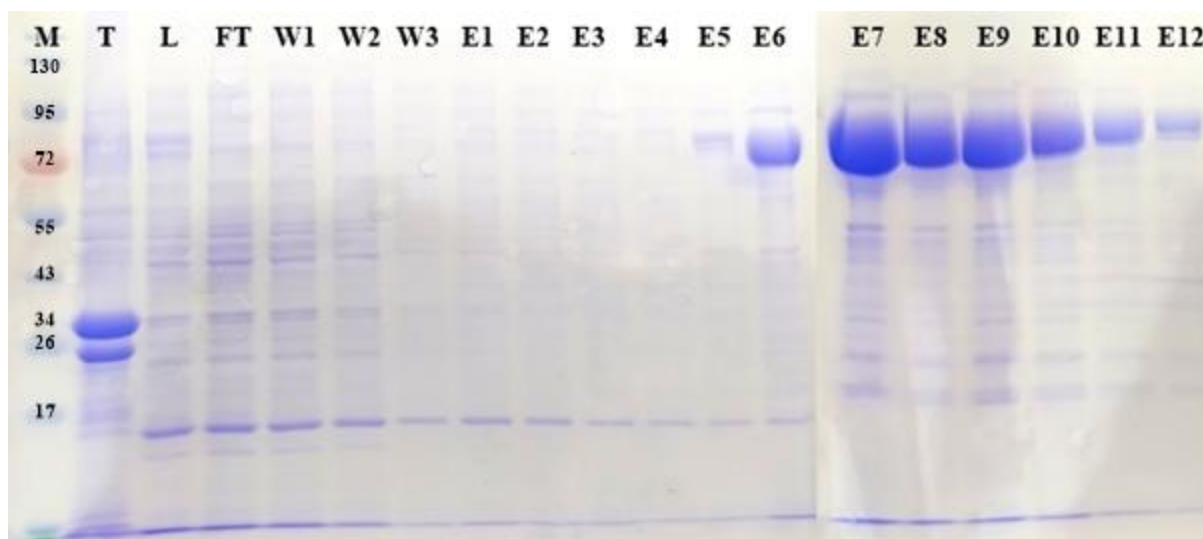
Slika 20. Rezultati SDS-poliakrilamid gel elektroforeze nakon pročišćavanja „divljeg“ tipa hDPP III. M-marker molekulskih masa, T-talog nakon sonikacije, L-lizat, FT-nevezana frakcija, W1-W3- frakcije nakon ispiranja kolone, E1-E9- frakcije eluiranog proteina.

Na slici 21 prikazani su rezultati SDS-poliakrilamid gel elektroforeze mutanta E480Q. Najveću količinu proteina imale su frakcije E5-E9, te su one spojene ($V_{UK}=2,6$ mL) i korištene za daljnje pročišćavanje.



Slika 21. Rezultati SDS-poliakrilamid gel elektroforeze nakon pročišćavanja mutanta E480Q. M-marker molekulskih masa, T-talog nakon sonikacije, L-lizat, FT-nevezana frakcija, W1-W3- frakcije nakon ispiranja kolone, E1-E10- frakcije eluiranog proteina.

Rezultati analize SDS-poliakrilamid gel elektroforeze mutanta T481M prikazani su na slici 22. Iz gela je vidljivo da je pročišćavanje bilo uspješno, a najveću količinu proteina imale su frakcije E6-E10. Navedene frakcije su spojene u ukupni volumen od 2,6 mL i korištene za daljnje pročišćavanje.



Slika 22. Rezultati SDS-poliakrilamid gel elektroforeze nakon pročišćavanja mutanta T481M. M-marker molekulske mase, T-talog nakon sonikacije, L-lizat, FT-nevezana frakcija, W1-W3- frakcije nakon ispiranja kolone, E1-E12- frakcije eluiranog proteina.

Odabrane frakcije spojene su u plastičnu epruvetu u volumenu od 2,6 mL. Spojene frakcije od sva tri proteina odsoljene su na PD-10 kolonama. Koncentracija prije i poslije odsoljavanja određena je mjerenjem na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop*, a dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 8.

Tablica 8. Određene koncentracije enzima hDPP III prije i nakon odsoljavanja izmjerene na uređaju *BioDrop*.

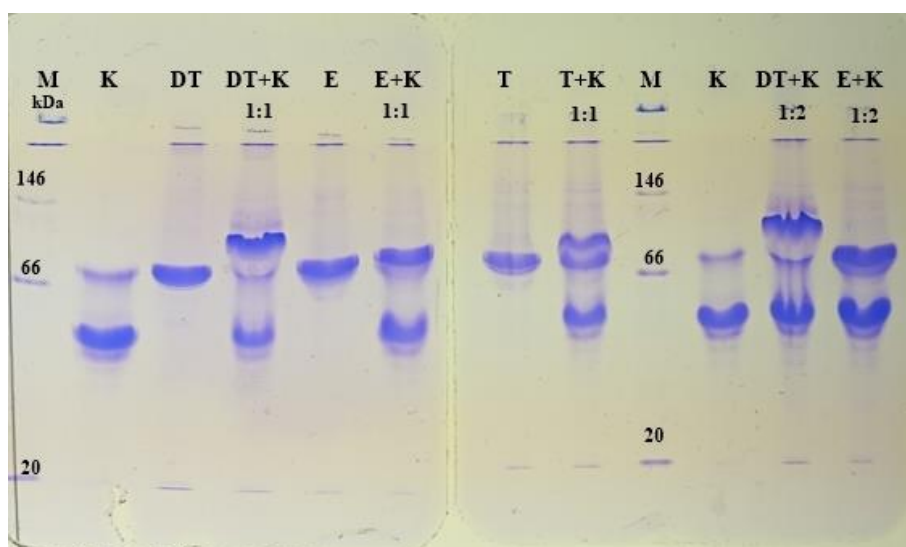
Protein	„divlji“ tip hDPP III	E480Q	T481M
Prije odsoljavanja	4,195 mg / mL	8,175 mg / mL	4,789 mg / mL
Odsoljeni	3,583 mg / mL	4,212 mg / mL	3,898 mg / mL

4.2. Analiza vezanja hDPP III sa Keap1

4.2.1. Nativna elektroforeza

Kod native elektroforeze, na gel su nanešeni uzorci svakog enzima zasebno, Kelch domene zasebno kao i u kombinacijama 1:1 i 1:2 (hDPP III : Kelch). Korišten je marker *Invitrogen Native mark* koji ima raspon veličine fragmenata 20 – 1200 kDa.

Dobiveni rezultati prikazani su na slici 23. Analizom gela vidljivo je da enzim zasebno ima jedan fragment koji se nalazi malo iznad vrijednosti od 66 kDa, što odgovara molekulknoj masi enzima od ~80 kDa. Domena Kelch pokazuje dvije vrpce, donja vrpca odgovara molekulknoj masi domene Kelch koja iznosi ~34 kDa, a druga vrpca je dimer molekulske mase ~70 kDa [69]. Vezanje hDPP III na domen Kelch vidljivo je nastankom treće vrpce koja se nalazi između vrijednosti 66 i 146 kDa, a predstavlja nastali kompleks molekulske mase ~114 kDa. Kod mutanta T481M također su vidljive tri vrpce, te je vrpca kompleksa podjednako velika kao i vrpca slobodne hDPP III zbog čega je zaključeno da mutant T481M veže domen Kelch slabije. Srednja vrpca predstavlja količinu nevezanih proteina. Na gelu je također vidljivo da je omjer vezanih i nevezanih proteina puno veći kod „divljeg“ tipa nego kod mutanta T481M što dodatno potvrđuje slabije vezanje Kelch domene kod T481M. Kod mutanta E480Q nije vidljiva vrpca kompleksa veličine ~114 kDa čime je zaključeno da mutant E480Q ne veže Kelch domen.



Slika 23. Rezultati native gel elektroforeze: M – marker molekularne mase, K-Kelch domena, DT-„divlji“ tip hDPP III, E-mutant E480Q, T-mutant T481M.

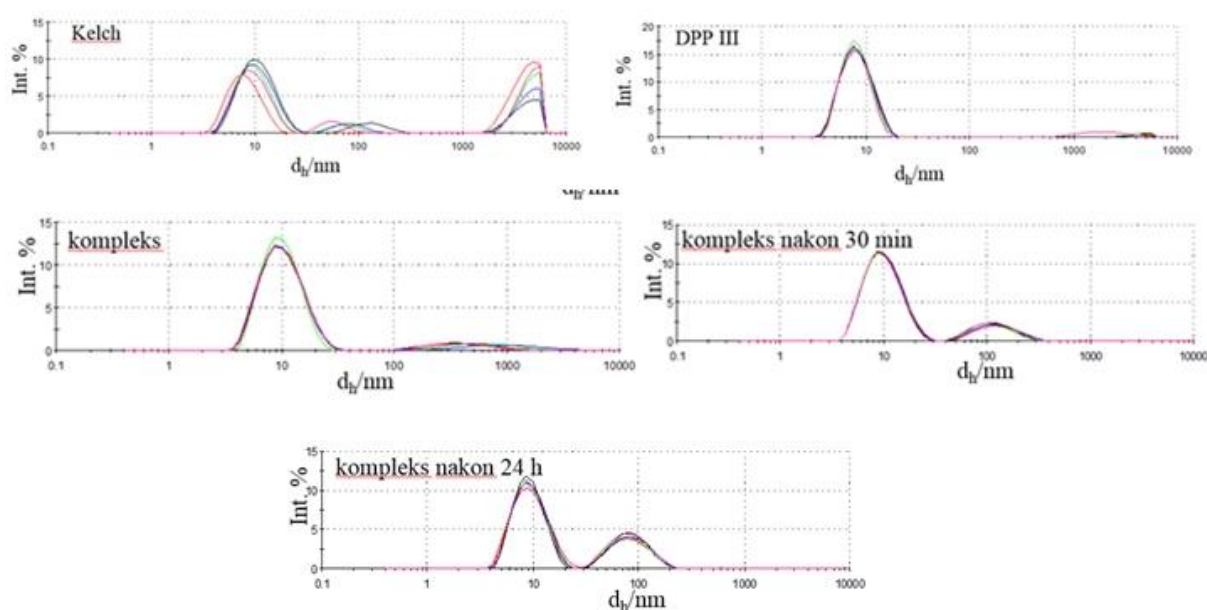
4.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Vežanje „divljeg“ tipa hDPP III kao i mutanata E480Q i T481M s domenom Kelch proteina Keap1 u omjeru 1:1 izmjereno je DLS metodom. Kod „divljeg“ tipa mjerenje je izvršeno nakon miješanja hDPP III i domene Kelch, te nakon proteka inkubacije od 30 min i 24h. Kod mutiranih proteina mjerenje je izvršeno nakon miješanja mutanata hDPP III i domene Kelch, te nakon inkubacije od 60min.

Uočeno je da oba proteina („divlji“ tip hDPP III i domena Kelch) zasebno pokazuju vrijednosti hidrodinamičkih radijusa približno 10 nm, te da se nakon njihovog miješanja smanjuje udio agregiranog proteina znatno većeg od monomernog proteina. Stvaranjem kompleksa dolazi do pojave sve većeg udjela čestica, prvo radijusa ~600 nm, a zatim i radijusa ~100 nm. U području od 100 nm uočava se vjerojatna pojava dimera domene Kelch. Zastupljenost čestica te veličine je znatno veća u kompleksu nego u samom uzorku s domenom Kelch što potvrđuje vežanje domene Kelch sa hDPP III. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 9 i na slici 24.

Tablica 9. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa prema postotku intenziteta raspršene svjetlosti određena DLS-om za „divlji“ tip hDPP III i domenu Kelch zasebno te njihov kompleks neposredno nakon miješanja dvaju proteina, nakon 30 min i nakon 24 h inkubacije.

	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch	9.9±1.1	59.7±7.4	86.9±32.1	6.0±1.1	4201.2±143.8	34.3±10.4
hDPP III	8.3±0.2	96.1±2.9	3913.0±985.8	3.9±2.9		
kompleks	10.7±0.1	91.0±0.6	640.5±310.4	9.0±0.6		
kompleks 30 min	10.5±0.1	81.9±1.1	126.2±8.4	18.1±1.1		
kompleks 24 h	9.7±0.2	68.7±1.8	86.9±1.8	31.3±1.8		



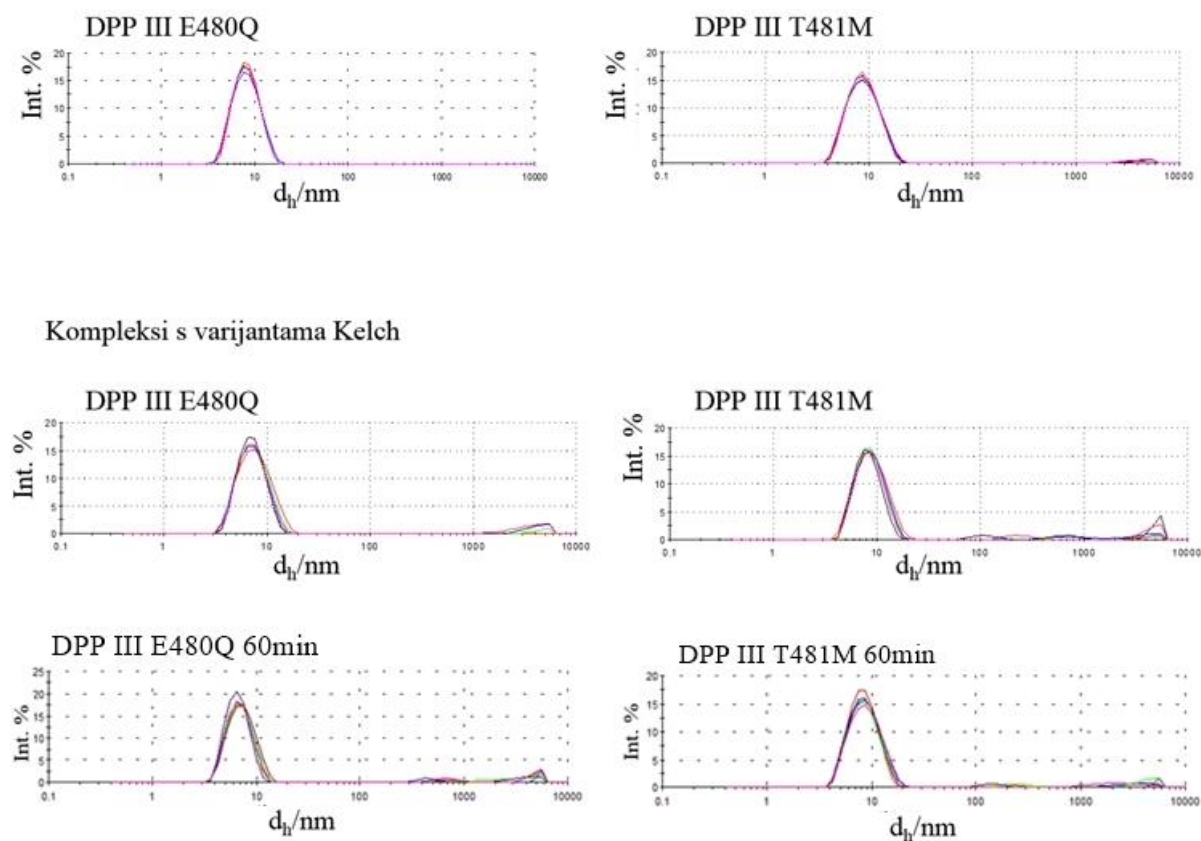
Slika 24. Grafikoni raspodjele hidrodinamičkih radijusa prema postotku intenziteta raspršene svjetlosti određena DLS-om za „divlji“ tip hDPP III i domenu Kelch zasebno te njihov kompleks neposredno nakon miješanja dvaju proteina, nakon 30 min i nakon 24 h inkubacije.

Oba mutanta, E480Q i T481M u zasebnom mjerenju pokazala su vrijednosti hidrodinamičkih radijusa ~ 10 nm kao i „divlji“ tip hDPP III. Miješanjem proteina koje sadrže mutaciju sa domenom Kelch nije primjećen signal veličine ~ 100 nm kao kod „divljeg“ tipa hDPP III. Nakon inkubacije od 60 min kod mutanta T481M uočen je slabi signal veličine ~ 100 nm koji je blizak promatranom signalu za „divlji“ tip proteina dok kod mutanta E480Q nije došlo do pojave signala nakon inkubacije od 60 min. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 10 i na slici 25.

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je vezanje domene Kelch s mutantom T481M vrlo slabo i da sporo dolazi do njene formacije nakon miješanja navedenih proteina, te da se mutant E480Q ne veže na domen Kelch. Takvo opažanje je u skladu s rezultatima dobivenim nativnom elektroforezom.

Tablica 10. Raspodjela hidrodinamičkih radijusa prema postotku intenziteta raspršene svjetlosti određena DLS-om za mutante E480Q i T481M zasebno te u kompleksu sa domenom Kelch neposredno nakon miješanja dvaju proteina i nakon 60 min inkubacije.

	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
Kelch	9.9±1.1	59.7±7.4	86.9±32.1	6.0±1.1	4201.2±143.8	34.3±10.4
hDPP III	8.3±0.2	96.1±2.9	3913.0±985.8	3.9±2.9		
hDPP III	8.3 ±	100 ± 0				
E480Q	0.1					
hDPP III	9.2 ±	97.4 ± 0.5	4181 ± 43	2.6 ±		
T481M	0.1			0.5		
kompleks varijanta:	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %	d_h / nm	Int. %
hDPP III	7.5 ±	94.4 ± 4.2	4253 ± 395	5.6 ±		
E480Q	0.3			3.3		
hDPP III	8.8 ±	90.0 ± 5.0	460.5 ± 338.7	3.1 ±	4375.4 ±	6.2 ± 2.7
T481M	0.3			0.3	429.6	
hDPP III	7.1 ±	91.2 ± 1.9	634.9 ± 162.2	2.0 ±	4500 ± 780	6.8 ± 2.4
E480Q 1h	0.3			1.3		
hDPP III	8.8 ±	93.8 ± 2.5	206.0 ± 56.0	1.6 ±	4232 ± 1236	4.5 ± 2.3
T481M 1h	0.2			0.8		



Slika 25. Grafikoni raspodjele hidrodinamičkih radijusa prema postotku intenziteta raspršene svjetlosti određena DLS-om za mutante E480Q i T481M zasebno te u kompleksu sa domenom Kelch neposredno nakon miješanja dvaju proteina i nakon 60 min inkubacije.

4.3. Analiza aktivnosti enzima

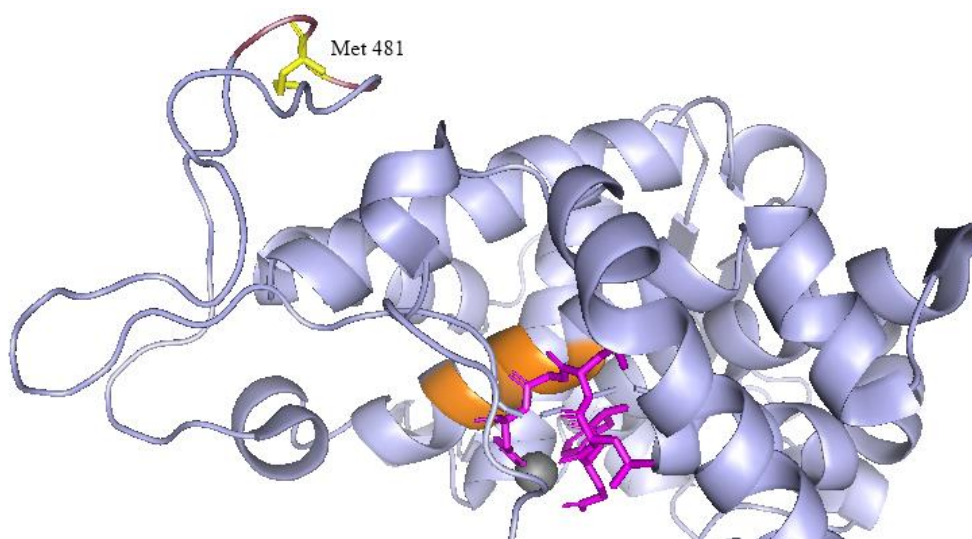
4.3.1. Test specifične aktivnosti

Koristeći sintetski supstrat Arg₂-2NA određena je specifična aktivnost enzima. Dobivene vrijednosti obrađene su koristeći *Microsoft Office Excel* i prikazane su u tablici 11.

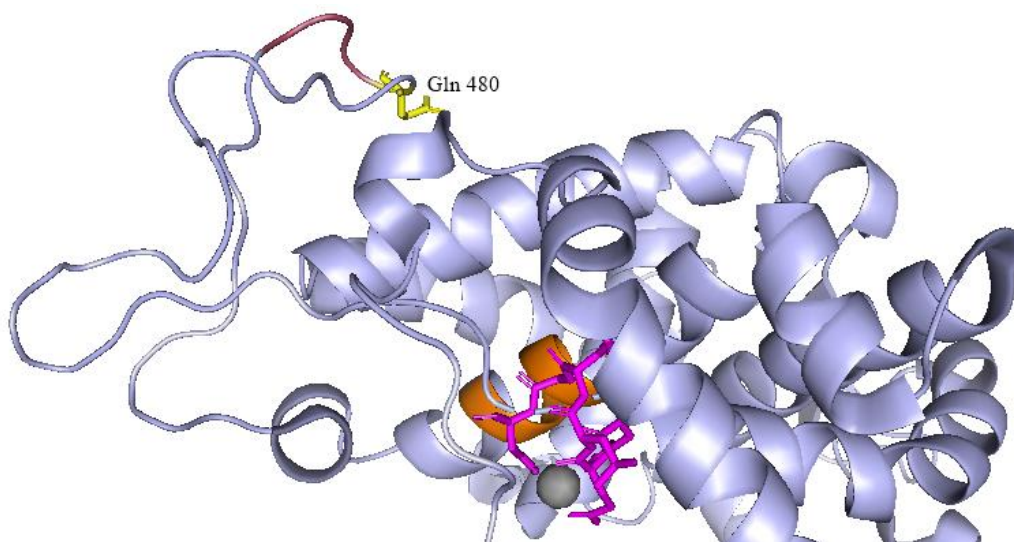
Tablica 11. Aktivnost „divljeg“ tipa i mutanata hDPP III prema supstratu Arg₂-2NA.

	„divlji“ tip	E480Q	T481M
Aktivnost ($\Delta A_{530}/\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	733	635	322
Specifična aktivnost/ $\text{nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	35 100,7	30 416,5	15 423,8

Dobivena vrijednost specifične aktivnosti za „divlji“ tip hDPP III nešto je niža od literaturne vrijednosti koja iznosi $47,9 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ [50]. Također, aktivnost pri ΔA_{530} „divljeg“ tipa enzima u dosadašnjim istraživanjima iznosila je oko $1000 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ što je 1,36x veće od dobivene vrijednosti. Aktivnost mutanta E480Q je približna dobivenoj vrijednosti aktivnosti „divljeg“ tipa čime možemo zaključiti da se uvođenjem ove mutacije aktivnost enzima ne mijenja značajno. Aktivnost mutanta T481M je ~2,3x manja nego kod „divljeg“ tipa hDPP III. Obje uvedene mutacije nalaze se na vrhu petlje koja sadrži ETGE motiv, te prema strukturi proteina nisu blizu aktivnog mjesta enzima što je vidljivo na slikama 26 i 27. Prema tome, možemo zaključiti da se aktivnost enzima ne mijenja značajno uvođenjem navedenih mutacija. Za navedene mutante vrijednosti aktivnosti su prvi put izmjerene zbog čega ih nije moguće usporediti sa prijašnjim istraživanjima.



Slika 26. Položaj aktivnog mjesta proteina hDPP III (plavo-sivo) i uvedene mutacije T481M. Mutacija (žuto) nalazi se na vrhu petlje koja sadrži ETGE motiv (tamno crveno) dok je aktivno mjesto enzima strukturno udaljeno od mutacije, a sastoji od dva strukturna motiva $^{450}\text{HELLGH}^{455}$ (magenta) koji koordinira ion Zn (siva kuglica) i $^{507}\text{EECRAE}^{512}$ (narančasto). Slika je napravljena pomoću programa *PyMOL*.



Slika 27. Položaj aktivnog mjesta proteina hDPP III (plavo-sivo) i uvedene mutacije E480Q. Mutacija (žuto) nalazi se na vrhu petlje koja sadrži ETGE motiv (tamno crveno) dok je aktivno mjesto enzima strukturno udaljeno od mutacije, a sastoji od dva strukturna motiva $^{450}\text{HELLGH}^{455}$ (magenta) koji koordinira ion Zn (siva kuglica) i $^{507}\text{EECRAE}^{512}$ (narančasto). Slika je napravljena pomoću programa *PyMOL*.

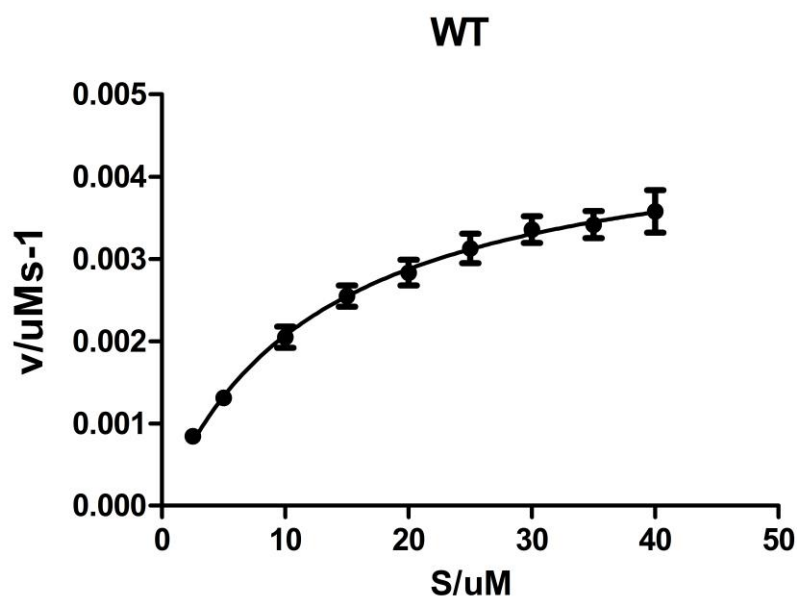
4.3.2. Kinetika enzimske reakcije

Kinetički parametri određeni su na fluorimetru praćenjem fluorescencije produkta 2-naftilamina. Budući da su „divlji“ tip i mutant E480Q pokazali sličnu aktivnost korištene su jednake koncentracije odnosno $0,02 \mu\text{mol dm}^{-3}$ dok je za mutant T481M korištena 2,5x veća koncentracija odnosno $0,05 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Dobiveni rezultati najprije su obrađeni programom *Microsoft Office Excel* nakon čega je izvršena nelinearna regresija koristeći softver *GraphPad Prism*. Dobiveni kinetički parametri nalaze se u tablici 12, a Michaelis-Menten grafovi ovisnosti brzine o koncentraciji supstrata nalaze se na slikama 28 – 30.

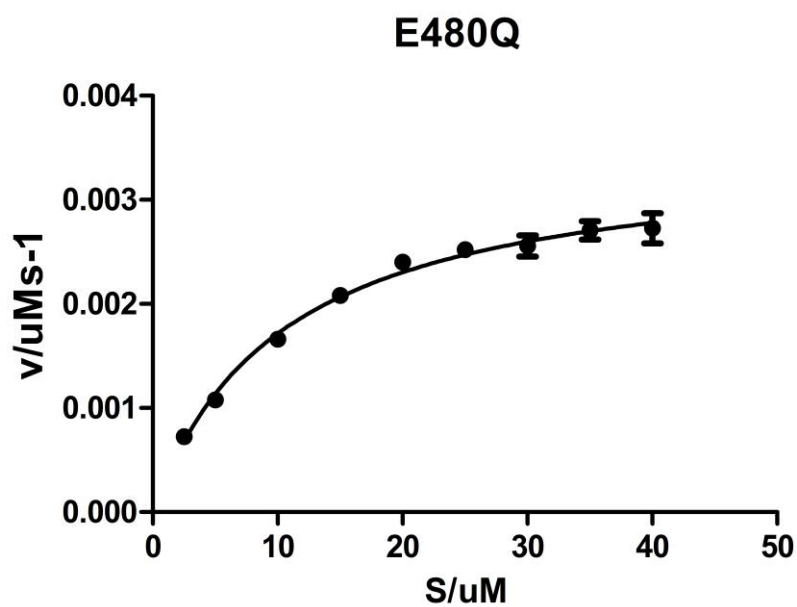
Tablica 12. Kinetički parametri „divljeg“ tipa i mutanata hDPP III dobiveni nelinearnom regresijom pomoću programa *GraphPad Prism*

hDPP III	$K_M / \mu\text{mol dm}^{-3}$	k_{cat} / s^{-1}	$V_{max} / 10^{-3} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_M \times 10^6 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
„divlji“ tip	$12,71 \pm 1,796$	$70,18 \pm 3,63$	4,702	5,698
E480Q	$10,42 \pm 0,965$	$52,28 \pm 1,62$	3,503	5,167
T481M	$10,01 \pm 1,055$	$26,45 \pm 0,91$	4,416	2,680

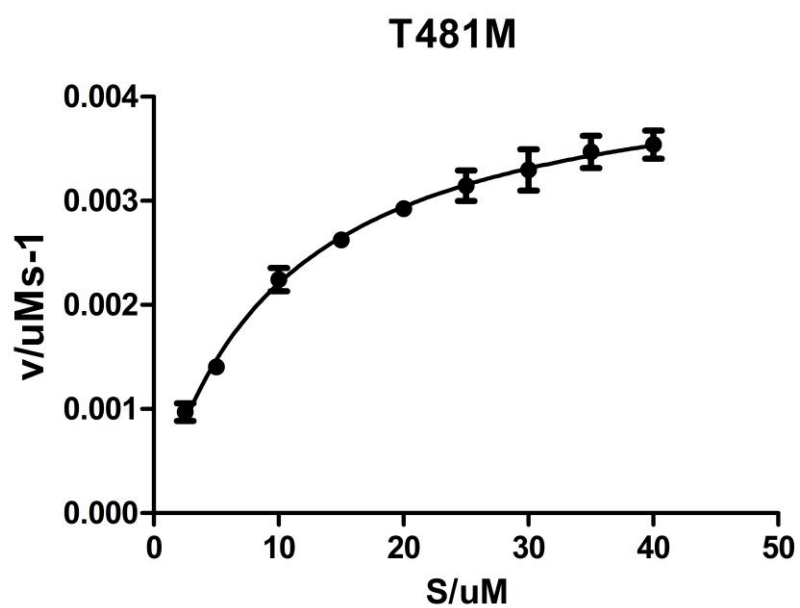
Iz dobivenih rezultata vidljivo je da „divlji“ tip hDPP III ima najveći obrtni broj (k_{cat}) odnosno najbrže pretvara supstrat u produkt. Mutant E480Q pokazuje nešto manji obrtni broj dok je kod mutanta T481M on 3x manji što odgovara rezultatima dobivenim mjerenjem specifične aktivnosti. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_M) koristi se za određivanje afiniteta enzima prema različitim supstratima, te je vidljivo da T481M ima 2,1x manji afinitet prema supstratu Arg₂-2NA od „divljeg“ tipa hDPP III. Razlike u vrijednosti K_M nisu velike, te možemo reći da su približne za sva tri enzima. Dobivene vrijednosti kinetičkih parametara K_M i k_{cat} za „divlji“ tip hDPP III su duplo veće nego u istraživanju Matovina i sur. 2017 [50].



Slika 28. Michaelis-Menten graf ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata za „divlji“ tip hDPP III dobiven pomoću programa *GraphPad Prism*.



Slika 29. Michaelis-Menten graf ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata za mutant hDPP III - E480Q dobiven pomoću programa *GraphPad Prism*.



Slika 30. Michaelis-Menten graf ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata za mutant hDPP III – T481M dobiven pomoću programa *GraphPad Prism*.

5. ZAKLJUČAK

- Metodom ciljane mutageneze uspješno su dobiveni plazmidi za ekspresiju mutiranih varijanti E480Q i T481M proteina hDPP III u bakterijama
- „divlji“ tip proteina hDPP III, i mutirane varijante E480Q i T481M su uspješno eksprimirani u bakterijama i pročišćeni afinitetnom kromatografijom.
- SDS-poliakrilamid gel elektroforezom potvrđena je molekulska masa hDPP III koja iznosi oko 83,5 kDa.
- Vezanje enzima hDPP III sa Kelch domenom proteina Keap1 ispitano je metodom native elektroforeze gdje je vidljivo da mutant T481M slabo veže Kelch domenu, a mutant E480Q se uopće ne veže.
- Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti također je utvrđeno da se mutant T481M slabo veže na domenu Kelch proteina Keap1 dok se mutant E480Q uopće ne veže.
- Dobivena vrijednost aktivnosti „divljeg“ tipa hDPP III prema supstratu Arg₂-2NA je ~1,4x manja nego kod prijašnjih istraživanja i iznosi 733 min⁻¹ mg⁻¹.
- Mutant E480Q pokazuje ~86,6% aktivnosti prema supstratu Arg₂-2NA dok mutant T481M ima upola manju aktivnost od „divljeg“ tipa hDPP III odnosno ~43,9%.
- Dobiveni kinetički parametri za „divlji“ tip hDPP III ($K_M = 12,71 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 70,18 \text{ s}^{-1}$) su duplo veći od dosad dobivenih vrijednosti.
- Kod mutanta E480Q kinetički parametri ($K_M = 10,42 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 52,28 \text{ s}^{-1}$) nisu znatno niži od onih za „divlji“ tip hDPP III što ukazuje na to da se aktivnost nije bitno promijenila uvođenjem ove mutacije.

- Mutant T481M pokazuje približno jednaku vrijednost Michaelisove konstante ($K_M = 10,01 \mu\text{M}$) kao i mutant E480Q, međutim obrtni broj je u odnosu na „divlji“ tip hDPP III 3x manji ($k_{cat} = 26,45 \text{ s}^{-1}$) dok je konstanta specifičnost upola manja.

6. LITERATURNI IZVORI

- [1] J. Mótyán, F. Tóth i J. Tőzsér, *Biomolecules*, 3 (2013.), 923–942.
- [2] N. Cerdà-Costa i F. X. Gomis-Rüth, *Protein Sci.*, 23 (2014.), 123–144.
- [3] A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith i S. Tomic, *J. Mol. Recognit.*, 24 (2011.), 804–814.
- [4] Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem i M. Abramić, *Gynecol. Oncol.*, 91 (2003.), 194–200.
- [5] H. Motohashi i M. Yamamoto, *Trends Mol. Med.*, 10 (2004.), 549–557.
- [6] M. S. Yates, Q. T. Tran, P. M. Dolan, W. O. Osburn, S. Shin, C. C. McCulloch, J. B. Silkworth, K. Taguchi, M. Yamamoto, C. R. Williams, K. T. Liby, M. B. Sporn, T. R. Sutter i T. W. Kensler, *Carcinogenesis*, 30 (2009.), 1024–1031.
- [7] <https://www.cbioportal.org/>, (pristupljeno 01. travanj 2021.).
- [8] P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, *Sci. Rep.*, 6 (2016.), 1–10.
- [9] A. J. Barrett, *Eur. J. Biochem.*, 250 (1997.), 1–6.
- [10] N. Kulkarni, A. Shendye i M. Rao, *FEMS Microbiol. Rev.*, 23 (1999.), 411–456.
- [11] B. N. D. Rawlings i A. J. Barrett, Evolutionary families of metallopeptidases In *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*, 1995.
- [12] <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?id=M49.001;type=P>, (pristupljeno 22. ožujak 2021.).
- [13] N. D. Rawlings, A. J. Barrett i A. Bateman, *Nucleic Acids Res.*, 38 (2009.), 325–331.
- [14] N. D. Rawlings, D. P. Tolle i A. J. Barrett, *Biochem. J.*, 378 (2004.), 705–716.
- [15] N. M. Hooper, *FEBS Lett.*, 354 (1994.), 1–6.
- [16] N. D. Rawlings i G. Salvesen, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2013.
- [17] K. M. Fukasawa, T. Hata, Y. Ono i J. Hirose, *J. Amino Acids*, 2011 (2011.), 1–7.
- [18] J. K. McDonald i A. J. Barrett, *Mammalian Proteinases: A Glossary and Bibliography Volume 2 Exopeptidases*, Academic Press, London, 1987.
- [19] S. Ellis i J. M. Nuenke, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967.), 4623–4629.

- [20] Y. Shimamori, Y. Watanabe i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 34 (1986.), 3333–3340.
- [21] M. A. Sentandreu i F. Toldrá, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998.), 3977–3984.
- [22] M. Abramić, M. Zubanović i L. Vitale, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, 369 (1988.), 29–38.
- [23] K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose i M. Harada, *Biochemistry*, 38 (1999.), 8299–8303.
- [24] Y. Watanabe, Y. Kumagai i Y. Fujimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 38 (1990.), 246–248.
- [25] W. S. Choi, Q. Fu i T. H. D. Jones, *Biochem. Mol. Biol.*, 47 (1999.), 455–464.
- [26] S. C. Prajapati i S. S. Chauhan, *FEBS J.*, 278 (2011.), 3256–3276.
- [27] K. Lu, A. L. Alcivar, J. Ma, T. K. Foo, S. Zywea, A. Mahdi, Y. Huo, T. W. Kensler, M. L. Gatzka i B. Xia, *Cancer Res.*, 77 (2017.), 2881–2892.
- [28] B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes i M. B. Major, *Cancer Res.*, 73 (2013.), 2199–2210.
- [29] Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz i H. Luesch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (2007.), 5205–5210.
- [30] C. M. Lee i S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982.), 12043–12050.
- [31] J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, *Bioorg. Chem.*, 37 (2009.), 70–76.
- [32] P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić i K. Gruber, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008.), 22316–22324.
- [33] P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, *Sci. Rep.*
- [34] G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109 (2012.), 6525–6530.
- [35] A. Tomić, B. Kovačević i S. Tomić, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (2016.), 27245–27256.
- [36] G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109 (2012.), 6525–6530.
- [37] A. Tomić, M. González i S. Tomić, *J. Chem. Inf. Model.*, 52 (2012.), 1583–1594.

- [38] D. D. Zhang, *Drug Metab. Rev.*, 38 (2006.), 769–789.
- [39] P. Canning, F. J. Sorrell i A. N. Bullock, *Free Radic. Biol. Med.*, 88 (2015.), 101–107.
- [40] W. S. Jeong, M. Jun i A. N. T. Kong, *Antioxidants Redox Signal.*, 8 (2006.), 99–106.
- [41] S. C. Lo, X. Li, M. T. Henzl, L. J. Beamer i M. Hannink, *EMBO J.*, 25 (2006.), 3605–3617.
- [42] K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka i M. Yamamoto, *Mol. Cell. Biol.*, 26 (2006.), 2887–2900.
- [43] M. C. Jaramillo i D. D. Zhang, *Genes Dev.*, 27 (2013.), 2179–2191.
- [44] S. Matić, I. Kekez, M. Tomin, F. Bogár, F. Šupljika, S. Kazazić, M. Hanić, S. Jha, H. Brkić, B. Bourgeois, T. Madl, K. Gruber, P. Macheroux, D. Matković-Čalogović, M. Matovina i S. Tomić, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, (2020.), 1–12.
- [45] L. Stryer, J. L. Tymoczko i J. M. Berg, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [46] https://www.researchgate.net/figure/Michaelis-Menten-diagram_fig11_268373910, (pristupljeno 27. ožujak 2021.).
- [47] N. Carrillo, E. A. Ceccarelli i O. A. Roveri, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 27 (2010.), 367–382.
- [48] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44 (1958.), 98–104.
- [49] I. Schechter i A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 (1967.), 157–162.
- [50] M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, S. Matić, Z. Karačić i S. Tomić, *RSC Adv.*, 7 (2017.), 36326–36334.
- [51] J. Rokov Plavec, *Nastavni materijal iz kolegija Genetičko i proteinsko inženjerstvo*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2019.
- [52] Thermo Fisher Scientific, *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System*, .
- [53] Računalni program SnapGene, GSL Biotech LLC, v5.2.
- [54] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_130443.4, (pristupljeno 27. ožujak 2021.).
- [55] Agilent, *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*, .
- [56] <https://benchling.com/protocols/gdD7XI0J/luria-bertani-lb-medium-preparation>, (pristupljeno 02. travanj 2021.).
- [57] <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>, (pristupljeno 29. ožujak 2021.).

- [58] Thermo Fisher Scientific, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, .
- [59] <https://www.goldbio.com/uploads/documents/fbe2a5f17ec745aed8d6e5e7ff2eaaae.pdf>, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [60] <https://www.profacgen.com/wp-content/themes/profacgen/img/Protein-purification-by-chromatography.jpg>, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [61] <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0007750.g001>, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [62] <https://www.biologicscorp.com/wp-content/uploads/2016/04/protein-purification-lecture-35-638.jpg>, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [63] https://2020.igem.org/wiki/images/3/3d/T--Queens_Canada--pur-summ-1.png, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [64] <https://slideplayer.it/slide/10456579/33/images/21/Caricamento+del+campione+per+una+corsa+di+elettroforesi+su+gel.jpg>, (pristupljeno 30. ožujak 2021.).
- [65] GE Healthcare, PD-10 Desalting Columns, .
- [66] Thermo Fisher Scientific, Native PAGE Gels - HR, .
- [67] J. Stetefeld, S. A. McKenna i T. R. Patel, *Biophys. Rev.*, 8 (2016.), 409–427.
- [68] F. A. Carey, Organic Chemistry, McGraw-Hill, New York, 2003., 5th edn.
- [69] <https://www.rcsb.org/structure/1u6d>, (pristupljeno 11. travanj 2021.).

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Monika Martinčić

Datum rođenja: 12.08.1994.

Mjesto rođenja: 48000 Koprivnica

Obrazovanje

2001. – 2009. Osnovna škola Ljudevita Modeca, Križevci
2009. – 2013. Srednja gospodarska škola Križevci
zvanje: veterinarski tehničar
2014. – 2017. Preddiplomski studij kemije, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju
zvanje: Sveučilišna prvostupnica kemije
2017. – 2020. Diplomski studij kemije, Sveučilište u Zagrebu, Kemijski odsjek,
smjer istraživački: biokemija i fizikalna kemija
2020. – 2021. Diplomski studij kemije, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, smjer istraživački: analitička kemija, organska kemija i biokemija
zvanje: magistrica kemije

Publikacije

1. M.Martinčić, *Mitohondrijski proteini razdvajanja i otpornost na inzulin kod dijabetesa*, završni rad, 2017.
2. A.Barišić, M.Martinčić, T.Preočanin, *Temperature effects on the inert material/aqueous electrolyte solution interface*, 32nd ECIS Conference: Book of Abstracts, Ljubljana: University of Ljubljana, 2018. str. 73-73 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)